

Neue Ansätze zur Entwicklung von Modulatoren der homodimeren tRNA-Guanin-Transglycosylase

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Andreas Nguyen

aus **Göttingen**

Marburg/Lahn 2020

Für
meine Mutter
Hansi und Ulla Burr

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2017 bis Juli 2020 am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg unter Betreuung von PROF. DR. GERHARD KLEBE angefertigt.

Erstgutachter	PROF. DR. GERHARD KLEBE Institut für Pharmazeutische Chemie Philipps-Universität Marburg
---------------	--

Zweitgutachter	PROF. DR. KLAUS REUTER Institut für Pharmazeutische Chemie Philipps-Universität Marburg
----------------	---

Eingereicht am 20.08.2020
Tag der mündlichen Prüfung am 06.10.2020
Hochschulkennziffer: 1180

Publikationen und Poster

Journal Publikationen

¹⁹F NMR Unveils Conformational Changes at Homodimer Contacts of tRNA-Guanine Transglycosylase.

A. Nguyen, G. Gemmecker, C. Softley, L. D. Movsisyan, T. Pfaffeneder, L. J. Barandun, J. Kalim, A. Heine, F. Diederich, M. Sattler, G. Klebe.
Manuskript in Vorbereitung.

The Importance of Aromatic Residues Clustered at Protein-Protein Interface of the Homodimeric bacterial tRNA-Guanine Transglycosylase.

A. Nguyen*, D. Nguyen*, T. X. P. Nguyen, M. Sebastiani, S. Dörr, O. Hernandez-Alba, F. Debaene, S. Cianférani, A. Heine, G. Klebe, K. Reuter.
Manuskript in Vorbereitung.

Uncovering a Ligand-induced Twisted State of a Homodimeric Enzyme by Pulsed Electron-Electron Double Resonance.

D. Abdullin*, D. Nguyen*, C. Heubach, A. Nguyen, T. Pfaffeneder, J. Kalim, C. Hohn, L. J. Barandun, A. Heine, F. Diederich, O. Schiemann, G. Klebe
Manuskript in Vorbereitung.

Exposing a Druggable Binding Pocket at the Homodimeric Interface of tRNA-Guanine Transglycosylase by Disulfide-induced Re-symmetrization.

D. Nguyen, X. Xie, S. Jakobi, A. Nguyen, T. X. P. Nguyen, F. Terwesten, A. Heine, G. Klebe
Manuskript in Vorbereitung.

Sugar Acetonides are a Superior Motif for Addressing the Large, Solvent-Exposed Ribose-33 Pocket of tRNA-Guanine Transglycosylase (2018).

L. D. Movsisyan*, E. Schäfer*, A. Nguyen, F. R. Ehrmann, A. Schwab, T. Rossolini, D. Zimmerli, B. Wagner, H. Daff, A. Heine, G. Klebe, F. Diederich.
Chem Eur. J., 24, 9957–9967.

*Diese Autoren haben einen gleichwertigen Beitrag geleistet

Poster Präsentation

7th NovAliX Conference – Biophysikcs in Drug Discovery, Kyoto, Japan, November 13-15, 2019 (Poster Prize).

Poster in "¹⁹F NMR Unveils Conformational Changes at Homodimer Contacts of tRNA-Guanine Transglycosylase".

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Dissertation war die biophysikalische Charakterisierung einer Dimerstruktur am Beispiel der tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT). Für die intensive Untersuchung des Dimers wurden neben der Röntgenkristallographie auch enzymkinetische Messungen, isotherme Titrationskalorimetrie, native Massenspektrometrie, *Thermal-Shift*-Assays und proteinbasierte ^{19}F -NMR-Spektroskopie zur Untersuchung und Einflussnahme auf die Dimerstabilität durch die verwendeten Liganden eingesetzt.

Die *Z. mobilis* TGT katalysiert als Homodimer den Einbau einer modifizierten Base in die tRNA. Diese Modifikation ist von wesentlicher Bedeutung in der Pathogenese der entzündlichen Darmerkrankung Bakterienruhr, die durch *Shigellen* verursacht wird. Dazu tauscht die TGT die Purinbase Guanin in der *Wobble*-Position-34 von tRNAs^{Asn, Asp, His, Tyr} durch die modifizierte Base preQ₁ aus. Das von der Purinbase abgeleitete *lin*-Benzoguanin-Grundgerüst bindet kompetitiv in das aktive Zentrum des Proteins. Durch Einfügen von Modifikationen an C(2') bzw. C(4') können die angrenzenden Ribose-33/Uracil-33- und Ribose-34/Phosphat-35-Seitentaschen adressiert werden.

Dadurch dass die TGT das natürliche tRNA-Substrat nur im Verhältnis 2:1 (Monomer:tRNA) als Homodimer katalytisch umsetzen kann, stellt die Stabilisierung der Quartärstruktur in einer inkompetenten Anordnung neben der klassischen Blockierung des aktiven Zentrums eine alternative Form der Inhibition dar. Die Kontaktfläche der beiden TGT-Monomere (Dimer-Grenzfläche) befindet sich in unmittelbarer Nähe zur Ribose-34/Phosphat-35-Tasche. Durch Adressierung des hydrophoben Bereichs der vorherig erwähnten Tasche kann ein angrenzende Schleifen-Helix-Motiv in seiner Geometrie gestört werden, wodurch die mit einer massiven Umlagerung von bis zu 20 Aminosäuren verbundene Dimerstabilität reduziert wird. Drei Liganden wurden kristallographisch identifiziert, die durch ihre Bindung in der Ribose-34-Tasche eine "verdrehte" Anordnung des TGT-Dimers (*twisted dimer*) induzieren, wodurch die katalytische Aktivität aufgrund der Neuausrichtung nicht mehr möglich sein sollte. Mit Einführung einer Fluor-Sonde innerhalb des Dimers wurde das "verdrehte" Dimer unter nativen Bedingungen in Lösung untersucht (**Kapitel 2**). Die Ergebnisse der ^{19}F -NMR deuten darauf hin, dass das Schleifen-Helix-Motiv und dort vor allem der Rest Trp95 eine regulative Funktion in der Dimeranordnung bzw. -bildung tragen. Daher stellt die Modulation des formbaren Motivs mit geeigneten Liganden eine ideale Vorgehensweise zur Inhibition des Dimerproteins dar.

Innerhalb der Ribose-33/Uracil-33-Tasche wurde ein Wassernetzwerk durch Bindung von C(2')-Monosaccharid-modifizierten *lin*-Benzoguanin-Inhibitoren ladungsneutral ersetzt (**Kapitel 3**). Es zeigte sich zudem, dass Acetonid-geschützte Zuckermotive eine entscheidende Rolle zur Stabilisierung eines [5+5+4] Wasserclusters spielen und dadurch die Bindungsaffinität der

eingesetzten Liganden signifikant beeinflussen. Neben der Bindungsaffinität, steigert das eingesetzte Motiv die physikochemischen Eigenschaften der *lin*-Benzoguanin-Liganden.

Aufbauend auf einer früheren Studie wurde die TGT-Mutante Y330C eingeführt. Die untersuchte Kristallstruktur erlaubt zwar nicht die vollständige Strukturaufklärung des TGT-Monomers, zeigt aber eine Anordnung der Moleküle in der Raumgruppe $P6_522$ in einer weitgehend konformationsfreien Anordnung in der ursprünglichen Dimer-Grenzfläche. Interessanterweise wird die $\beta1\alpha1$ -Schleife (Thr47 - Lys55) in einer zuvor nicht beobachteten Konformation beobachtet. Die neue Anordnung der Schleife ist mit der Ausbildung der funktionalen Dimer-Grenzfläche nicht kompatibel. Daher bleibt die Bestimmung der Monomerstruktur ein noch zu lösendes Problem. Hierzu wurde ein MS-gekoppeltes *Tethering*-Screening an der Position Cys330 angewandt und die Suche nach optimalen Kristallisierungsbedingungen durchgeführt (**Kapitel 4**). Neben der Anwendung reversibler Disulfid-Binder, wurde das Konzept durch die Einführung von irreversiblen Bindern erweitert. Es stellte sich heraus, dass angewandte Acrylamide ein hohes Potenzial zur Modifikation von Cysteinresten besitzen und unabhängig von der Affinität des Fragments zum Zielprotein binden. Dies eröffnet eine neue Perspektive für Möglichkeiten der Dimer-Untersuchung.

Die Funktionalität der TGT ist nur in der dimeren Anordnung gewährleistet. Somit erscheint die Regulierung der Dimerbildung eine Möglichkeit zur Hemmung ihrer katalytischen Fähigkeit zu sein. Es wurde ein aus vier aromatischen Aminosäuren (Phe92', Trp326, Tyr330, His333) bestehender Cluster identifiziert, der für die Stabilität der Dimer-Grenzfläche essentiell ist. Durch die eingeführten Phenylalanin-Mutanten wurden die Wasserstoffbrücken gezielt entfernt, während der aromatische Charakter der Reste beibehalten wird (**Kapitel 5**). Die Wirkung auf die Dimer-Grenzfläche wurde durch Röntgenkristallstrukturanalyse, native Massenspektrometrie, Enzymkinetik und Bestimmung der Schmelztemperatur der jeweiligen Mutanten untersucht. Von größerer Bedeutung scheint die Position His333 zu sein, dessen Protonierungszustand die Stabilität der die Dimer-Grenzfläche stark beeinflusst. Dieses Erkenntnis beruht auch auf der Erfahrung, dass Kristalle, die bei pH 5.5 gezüchtet werden, eine ausgeprägtere Veränderung des strukturellen Schleifen-Helix-Motivs aufweisen. Darüber hinaus zeigt die Mutationsstudie, dass der Trp95-Rest, der sich in der Mitte des Schleifenhelix-Motivs befindet, in Bezug auf die Dimer-Regulation essentiell zu sein scheint. Die Reduzierung dieses Restes zu Phenylalanin bewirkt eine signifikante Verringerung der Schmelztemperatur $>15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Weiterhin werden Dimerisierungsrate, Strukturstabilität des Schleifen-Helix-Motivs und Bindungsverhalten von unterschiedlich substituierten Liganden die in **Kapitel 2** genauer charakterisiert werden, deutlich beeinflusst.

Abstract

The aim of this dissertation was the biophysical characterization of the dimer structure of tRNA-guanine transglycosylase (TGT) as a case study. In addition to X-ray crystallography, enzyme kinetic measurements, isothermal titration calorimetry, native mass spectrometry, thermal shift assay and protein-based ^{19}F NMR spectroscopy were used for the comprehensive study of the ligand-induced influence on dimer stability.

The *Z. mobilis* TGT catalyzes the incorporation of a modified nucleobase into the tRNA as a homodimer. This modification is essential in the pathogenesis of the inflammatory bowel disease dysentery caused by *Shigella*. For this purpose, TGT replaces the purine base guanine at the wobble position-34 of tRNAs^{Asn, Asp, His, Tyr} with the modified nucleobase preQ₁. The *lin*-benzoguanine scaffold derived from the purine base competitively binds to the active site of the protein. By inserting modifications at the C(2') or C(4') positions, the adjacent ribose-33/uracil-33 and ribose-34/phosphate-35 site pockets can be addressed.

Since TGT can catalytically convert the natural tRNA substrate only in a 2:1 ratio (monomer:tRNA) as a homodimer, the stabilization of the quaternary structure in an incompetent arrangement represents an alternative way of inhibition besides the classical blocking of the active site. The contact surface of the two TGT monomers (dimer interface) falls close to the ribose-34/phosphate-35 pocket. By addressing the hydrophobic region of the above-mentioned pocket, the geometry of an adjacent loop-helix motif can be disturbed, reducing the dimer stability associated with a massive rearrangement of up to 20 amino acids. Three ligands have been crystallographically identified which, when bound in the ribose-34 pocket, induce a "twisted" arrangement of the TGT dimer (twisted dimer), which should prevent catalytic activity due to its rearrangement in a catalytically incompetent geometry. By introducing a fluorine probe inside the dimer, the "twisted" dimer was investigated under native conditions in solution (**Chapter 2**). The ^{19}F NMR results indicate that the loop-helix motif and especially the amino acid Trp95 have a regulatory function for the dimer arrangement and formation. Therefore, modulation of the malleable motif with suitable ligands appears as an ideal concept to inhibit the dimer protein.

Within the ribose-33/uracil-33 pocket, a water network was replaced by binding of C(2')-monosaccharide-modified *lin*-benzoguanine inhibitors in a charge-neutral manner (**Chapter 3**). It was also shown that acetamide-protected sugar motifs play a decisive role in the stabilization of a [5+5+4] water cluster and thus significantly influencing the binding affinity of the applied ligands. In addition to the binding affinity, the motif used increases the physicochemical properties of the *lin*-benzoguanine ligands.

Based on an earlier study, the TGT mutant Y330C was introduced. Although the crystal structure under investigation does not allow the complete structural elucidation of the TGT monomer, it shows an arrangement of the molecules in space group $P6_522$ in a largely unconstrained arrangement lacking restrictions from the packing of the neighboring dimer mate. Interestingly, the $\beta 1 \alpha 1$ loop (Thr47 – Lys55) is observed in a previously unobserved conformation. The new arrangement of the loop is not compatible with the formation of the functional dimer interface. Therefore, the determination of the monomer structure remains an unresolved problem. For this purpose, MS-coupled tethering screening was applied at the Cys330 position for the search of optimal crystallization conditions (**Chapter 4**). In addition to the use of reversible disulfide binders, the concept has been extended by the introduction of irreversible binders. It turned out that acrylamides used have a high potential for the modification of cysteine residues and bind irrespectively of the affinity of the fragment to the target protein. This opens up a new perspective for possibilities of dimer investigation.

The functionality of TGT is only guaranteed in the dimeric arrangement. Thus, the regulation of dimer formation seems to be a possibility to inhibit its catalytic capability. A cluster consisting of four aromatic amino acids (Phe92', Trp326, Tyr330, His333) was identified, which is essential for the stability of the dimer interface. By introducing phenylalanine mutants, the hydrogen bonds have been selectively removed, while the aromatic character of the residues is preserved (**Chapter 5**). The effect on the dimer interface was investigated by X-ray crystallography, native mass spectrometry, enzyme kinetics and the determination of the melting temperature of the respective mutants. The position His333 seems to be of greater importance, and seemingly its protonation strongly influences the stability of the dimer interface. This finding is also based on the experience that crystals grown at pH 5.5 show a more pronounced change in the structural loop-helix motif. Also, the mutagenesis study shows that the Trp95 residue, which is located in the center of the loop-helix motif, appears to be essential concerning dimer regulation. The reduction of this residue to phenylalanine causes a significant depression of the melting temperature by $>15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Furthermore, dimerization rate, structural stability of the loop-helix motif and binding behavior of differently substituted ligands, which are characterized more in detail in **chapter 2**, are significantly influenced.

Inhaltsverzeichnis

1. ALLGEMEINE EINLEITUNG	1
1.1 HINTERGRUNDINFORMATIONEN ZUR BAKTERIENRUHR	2
1.1.1 Übertragung, Krankheitsverlauf und Epidemiologie	2
1.1.2 ALLGEMEINE INFORMATIONEN ZU <i>SHIGELLEN</i>	3
1.1.3 ZELLULÄRE UND MOLEKULARE PATHOGENESE	4
1.2 tRNA-GUANIN-TRANSGLYCOSYLASE ALS ZIEL IN DER WIRKSTOFFFORSCHUNG	6
1.2.1 Rolle von VirF und tRNA-Guanin-Transglycosylase	6
1.2.2 STRUKTUR DER TGT VON <i>ZYMOMONAS MOBILIS</i>	7
1.2.3 BIOSYNTHESE VON QUEUIN IN PROKARYOTEN	11
1.2.4 TGT KATALYSIERTE BASENAUSTAUSCHREAKTION	12
1.3 ZIELE DER ARBEIT	14
2.FLUOR-NMR ENTHÜLLT LIGANDINDUZIERTES KONFORMATIONÄNDERUNGEN AN DER TGT	17
2.1 VORWORT	18
2.2 KURZFASSUNG	18
2.3 EINLEITUNG	19
2.3.1 Das verdrehte Homodimer	19
2.3.2 PROTEINBEOBACHTETE ¹⁹ F-NMR	22
2.3.3 ZIELSETZUNG	24
2.4 ERGEBNISSE	25
2.4.1 Expression und Reinigung von 5F-Trp-TGT	25
2.4.2 CHARAKTERISIERUNG VON TGT _{5FW}	26
2.4.3 ¹⁹ F-NMR-SPEKTREN VON TGT _{5FW} UND DEREN MUTANTEN	29
2.4.4 PROTEINBEOBACHTETE ¹⁹ F-NMR ZUR CHARAKTERISIERUNG NATIVER PROTEIN-LIGAND-WECHSELWIRKUNGEN.	31
2.5 ZUSAMMENFASSUNG	48
2.6 METHODEN	51
2.6.1 Gezielte Mutagenese durch PCR	51
2.6.2 PROTEINEXPRESSION UND REINIGUNG VON FLUOR-MARKIERTEN TGT VARIANTEN	51
2.6.3 ANALYTISCHE GRÖßENAUSCHLUSS-CHROMATOGRAPHIE	52
2.6.4 THERMAL-SHIFT-ASSAY	52
2.6.5 ¹⁹ F-NMR-SPEKTROSKOPIE	52
2.6.6 KRISTALLISATION UND KOKRISTALLISATION VON (FLUOR-MARKIERTEN) TGT-VARIANTEN MIT <i>LIN</i> -BENZOGUANINEN ZUR ADRESSIERUNG DER 34-RIBOSE-TASCHE	53
2.6.7 DATENSAMMLUNG UND PROZESSIERUNG	53
2.6.8 STRUKTURBESTIMMUNG, VERFEINERUNG UND ANALYSE	54
2.7 PDB ZUGANGSCODES	54
2.8 HINTERGRUNDINFORMATIONEN	55
2.8.1 Thermal-Shift-Assay	55

2.8.2	Kristallographische Tabelle	56
-------	-----------------------------	----

3. ADRESSIERUNG DER RIBOSE-33-TASCHE **61**

3.1	VORWORT	62
3.2	KURZFASSUNG	62
3.3	EINLEITUNG	63
3.4	ERGEBNISSE	65
3.4.1	Bindungsaktivität und physikochemische Eigenschaften	65
3.4.2	KRISTALLSTRUKTURANALYSE	67
3.4.3	STRUKTUR-AKTIVITÄTSBEZIEHUNG	73
3.5	ZUSAMMENFASSUNG	76
3.6	METHODEN	77
3.6.1	Proteinexpression und Reinigung von WT TGT	77
3.6.2	KOKRISTALLISATION MIT EINFACHZUCKER-BASIERTEN <i>LIN</i> -BENZOGUANINEN ZUR ADRESSIERUNG DER 33-RIBOSE-TASCHE	78
3.6.3	DATENSAMMLUNG UND PROZESSIERUNG	78
3.6.4	STRUKTURBESTIMMUNG, VERFEINERUNG UND ANALYSE	78
3.6.5	MESSUNG DER THERMODYNAMISCHEN BINDUNGSPROFILE	79
3.6.6	SYNTHESE DER UNTERSUCHTEN TGT-INHIBITOREN	80
3.7	PDB ZUGANGSCODES	80
3.8	GENERELLE INFORMATIONEN	81
3.8.1	Kristallographische Tabelle	81
3.8.2	ITC MESSUNGEN	82

4. STÖRUNG DER ESSENTIELLEN PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN **87**

4.1	VORWORT	88
4.2	KURZFASSUNG	88
4.3	EINLEITUNG	89
4.3.1	<i>Tethering</i> : Fragment-basiertes Wirkstoffdesign	89
4.3.2	ZIELPROTEIN TGT Y330C	92
4.3.3	ZIELSETZUNG	95
4.4	ERGEBNISSE	96
4.4.1	Disulfid- <i>Tethering</i>	96
4.4.2	IRREVERSIBLES <i>TETHERING</i>	102
4.5	ZUSAMMENFASSUNG	108
4.6	METHODEN	111
4.6.1	Gezielte Mutagenese durch PCR	111
4.6.2	PROTEINEXPRESSION UND REINIGUNG VON TGT C158S/C281S/Y330C/H333A	111
4.6.3	<i>TETHERING</i> - EXPERIMENTE	112
4.6.4	SCREENING VON KRISTALLISATIONSBEDINGUNGEN AM MARXTAL	114
4.6.5	KOKRISTALLISATION VON TGT C158S/C281S/Y330C/H333A MIT 4.2	114
4.6.6	DATENSAMMLUNG UND PROZESSIERUNG	115
4.6.7	STRUKTURBESTIMMUNG, VERFEINERUNG UND ANALYSE	115

4.7	PDB ZUGANGSCODES	116
4.8	GENERELLE INFORMATIONEN	116
4.8.1	<i>Tethering</i> -Bibliothek	116
4.8.3	Kristallographische Tabelle	118
4.8.4	Massenspektren	119

5. DIE ROLLE DER LADUNG IM AROMATISCHEN *HOT SPOT* DER HOMODIMEREN TGT

5.1	VORWORT	122
5.2	KURZFASSUNG	122
5.3	EINLEITUNG	123
5.4	ERGEBNISSE	125
5.4.1	Strukturelle und biochemische Charakterisierung	125
5.4.2	Einfluss der tRNA auf die Dimer-Stabilität	131
5.4.3	DIE BESTÄNDIGKEIT DES DIMEREN ZUSTANDES DER TGT	132
5.5	DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG	133
5.6	METHODEN	137
5.6.1	Gezielte Mutagenese durch PCR	137
5.6.2	PROTEINEXPRESSION UND REINIGUNG	137
5.6.3	NATIVE MASSENSPEKTROMETRIE	137
5.6.4	HERSTELLUNG VON tRNA ^{Tyr}	138
5.6.5	KRISTALLISATION VERSCHIEDENER <i>Z. MOBILIS</i> TGT-DERIVATE	138
5.6.6	DATENSAMMLUNG UND PROZESSIERUNG	139
5.6.7	STRUKTURBESTIMMUNG, VERFEINERUNG UND ANALYSE	139
5.6.8	ENZYMKINETISCHE UNTERSUCHUNG UNTER VERWENDUNG DES RADIOAKTIVASSAYS	140
5.6.9	<i>THERMAL-SHIFT</i> -ASSAY	140
5.7	PDB ZUGANGSCODES	141
5.8	GENERELLE INFORMATIONEN	141
5.8.1	ENZYMKINETIK NACH MICHAELIS-MENTEN	141
5.8.2	KRISTALLOGRAPHISCHE TABELLE	145
5.8.3	<i>Thermal-Shift</i> -Assay	148

6. MATERIAL UND ALLGEMEINE METHODEN

6.1	LABORGERÄTE	152
6.2	CHEMIKALIEN UND VERWENDETE MATERIALIEN	153
6.3	PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN	154
6.4	BAKTERIENSTÄMME UND VEKTOREN	155
6.5	PRIMER ZUR GEZIELTEN MUTAGENESE	156
6.6	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	156
6.6.1	Gezielte Mutagenese durch PCR	156
6.7	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	157
6.7.1	Herstellung kompetenter Zellen	157

6.7.2	HEAT-SHOCK BASIERTE TRANSFORMATION	158
6.8	BIOCHEMISCHE METHODEN	158
6.8.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	158
6.8.2	UV/VIS-SPEKTROSKOPIE MIT <i>NANODROP™ 2000c</i>	158
6.8.3	SDS-PAGE	159
6.8.4	BESTIMMUNG DER INTAKTEN PROTEINMASSE, DENATURIEREND	160
7.	LITERATUR	163

Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
°C	Grad Celsius
ΔG°	Änderung der freien Standard-Gibbs-Energie
ΔH°	Änderung der freien Standard-Enthalpie
ΔS°	Änderung der freien Standard-Entropie
5F-Trp	5-Fluor-tryptophan
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
$A_{280\text{nm}}$	Absorption bei 280 nm
APS	Ammoniumpersulfat
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC-Nummer	<i>Enzyme Commission numbers</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
g	Gramm
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>
K	Kelvin
k-	Kilo
kbp	Kilobasenpaare
k_{cat}	Katalytische Konstante
K_d	Dissoziationskonstante am Gleichgewicht
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
L	Liter
μ	mikro (10^{-6})
m	Meter
M	Molarität (mol L^{-1})
$m z^{-1}$	Masse zu Ladung
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>molecular weight</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
PDB	Protein Data Bank
PDB Code	Protein Data Bank Kennzeichnung
PEG	Polyethylenglycol
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
RMSD	<i>root-mean-square deviation</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>

RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
T	Temperatur
TSA	<i>Thermal Shift Assay</i>
T_m	Schmelztempearatur
Tabl.	Tablette
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TGT	tRNA-Guanin-Transglycosylase
TGT _{5FW}	5F-Trp-tRNA-Guanin-Transglycosylase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tricin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
tRNA	Transfer-RNA
V	Volumen
v/v	<i>volume per volume</i>
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
<i>Z. mobilis</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>
λ	Wellenlänge
ppm	<i>parts per million</i>

1

Kapitel 1

Allgemeine Einleitung

1.1 Hintergrundinformationen zur Bakterienruhr

1.1.1 Übertragung, Krankheitsverlauf und Epidemiologie

Die Bakterienruhr oder Shigellose ist eine entzündliche Erkrankung des Dickdarms, die durch *Shigella*-Bakterien verursacht wird und zu den meldepflichtigen Durchfallerkrankungen in Deutschland gehört. Nach dem Eindringen in die Darmschleimhaut lösen die *Shigella*-Bakterien Entzündungsreaktionen aus, die mit kolikartigen Schmerzen, blutigem Stuhl, schweren Durchfällen und Fieber einhergehen. Die Übertragung von *Shigellen* wird indirekt durch verunreinigtes Wasser oder kontaminierte Lebensmittel verursacht und erfolgt in der Regel durch direkte Übertragung unter Schmierinfektion oder schlechten hygienischen Bedingungen. Die Vermehrung der *Shigellen* ist außerhalb eines Wirtes nicht möglich, dennoch genügen bereits zehn lebende Zellen um eine Erkrankung auszulösen.^[1]

Nach einer Infektion mit *Shigellen* beträgt die typische Inkubationszeit ein bis vier Tage.^[2] Die Bakterienruhr beginnt dann mit starken, kolikartigen Bauchschmerzen, Durchfall und Fieber. Anfangs kann der Stuhl wässrig sein, wird aber im Verlauf der Erkrankung typischerweise schleimig und blutig. Eine schwere Dehydratisierung des Körpers, charakteristisch für alle Durchfallerkrankungen, führt schließlich zu einem kritischen Krankheitsverlauf. Zusätzlich zu diesen Problematiken muss mit lebensbedrohlichen Komplikationen, wie Darmblutungen, -perforationen sowie Bauchfellentzündungen, gerechnet werden. Der Krankheitsverlauf hängt stark von verschiedenen Faktoren, wie z.B. dem infizierenden *Shigella*-Organismus, dem allgemeinen Gesundheitszustand und dem Alter des Patienten ab. Besonders bei Säuglingen, Kindern und älteren Menschen, kann sich die Bakterienruhr zu einer lebensbedrohlichen Situation entwickeln. Neben der Verbesserung der hygienischen Verhältnisse, liegt das Hauptaugenmerk der Behandlung auf der Flüssigkeits- und Elektrolytzufuhr. Der allgemeine Gesundheitszustand und die Widerstandsfähigkeit des Patienten spielen eine wichtige Rolle für die Schwere der Erkrankung. Aus diesem Grund ist die bakterielle Ruhrerkrankung in Krisengebieten und in Entwicklungsländern besonders kritisch. Analysen aus den Jahren 1966 – 1997, die in einem Übersichtsartikel aufgeführt sind, kommen zu dem Schluss, dass die jährliche Inzidenz der Shigellose weltweit 164.7 Millionen Fälle beträgt. Insbesondere ungünstige Bedingungen wie Armut, unzureichende sanitäre Einrichtungen, Kriege und Naturkatastrophen verschlechtern die hygienischen Verhältnisse und erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Ansteckung. Dies führte zu 163.2 Millionen dieser Fälle in Entwicklungsländern mit insgesamt 1.1 Millionen Todesfällen. Davon sind 69% aller Infektionen und 61% aller Todesfälle allein bei Kindern unter fünf Jahren zu verzeichnen.^[3] In der industrialisierten Welt, wie den USA, sind vor-

wiegend bei Militärtruppen und Urlaubern zunehmende Infektionszahlen zu beobachten. In den Vereinigten Staaten treten jährlich etwa 500.000 Fälle von Bakterienruhr auf.^[4,5]

Insbesondere bei sehr schweren Krankheitsverläufen wird von der WHO die Nutzung der Antibiotika Ciprofloxacin, Ceftriaxon oder Azithromycin empfohlen.^[6] Aufgrund zunehmender Resistenzen gestaltet sich die Therapie immer schwieriger. Für gängige Antibiotika (Ampicillin, Cotrimoxazol und Nalidixinsäure), die in den 1990er Jahren in großem Umfang eingesetzt wurden, sind inzwischen vermehrt Resistenzen bei *Shigella*-Organismen beobachtet worden. Eine Impfung gegen bakterielle Dysenterie ist eine attraktive Alternative zur Antibiotikatherapie. Dennoch steht bis heute kein zugelassener Impfstoff zur Verfügung. Die weltweit zunehmende Resistenz gegen Antibiotika und der Mangel an Impfstoffen gegen die verschiedenen *Shigella*-Arten erfordern dringend die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung der Bakterienruhr.

1.1.2 Allgemeine Informationen zu *Shigellen*

Shigellen sind stäbchenförmige, unbewegliche, Gram-negative Bakterien, die fakultativ anaerob und keine Sporen bilden.^[7] Als enteroinvasive Bakterien gehören sie zur Familie der *Enterobakteriazeen*, die sich früher aus *Escherichia coli* entwickelten.^[8] Interessanterweise haben sie im Gegensatz zu den enteroinvasiven *E. coli*-Stämmen keinen gemeinsamen evolutionären Ursprung, sondern haben ihre phänotypischen Merkmale durch konvergente Evolution entwickelt. Die Gattung *Shigella* kann in vier Arten unterteilt werden (*Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* und *Shigella boydii*), die wiederum in mehrere Serotypen gegliedert sind.^[9] Infektionen mit *S. dysenteriae* (16 Serotypen), die das starke zytotoxische Shiga-Toxin produziert, sind besonders schwerwiegend.^[10] Die Art tritt häufiger in tropischen und subtropischen Regionen auf. Die Spezies *S. flexneri* (sechs Serotypen) kann als weniger pathogen eingestuft werden und tritt weltweit häufiger in Entwicklungsländern auf. Bisher ist nur ein Serotyp von *S. sonnei* beschrieben worden. Diese Spezies gilt als weniger pathogen. Sie kommt in Mitteleuropa vor und wird häufig bei Reisenden und Soldaten beobachtet.^[5] Die Art *S. boydii*, die in Indien und Nordafrika vorkommt, hat acht Serotypen und kann als relativ harmlos eingestuft werden.^[9] Die einzelnen *Shigella*-Spezies entwickelten sich vermutlich mehrfach unabhängig voneinander durch Aufnahme eines großen Virulenzplasmids (ca. 130 – 220 Basenpaare) und dem anschließenden sukzessiven Verlust verschiedener chromosomal kodierter Gene, deren Produkte eine hemmende Wirkung auf die Pathogenität haben. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), die ebenfalls das Virulenzplasmid besitzen, zeigen eine sehr enge Verwandtschaft zu *Shigellen*, induzieren aber einen milderen Krankheitsverlauf als "echte"

Shigellen. Sie gelten als Zwischenstufen in der Evolution von harmlosen *E. coli* Bakterien zu *Shigellen*.^[11]

1.1.3 Zelluläre und molekulare Pathogenese

Die resultierende Infektiosität ist auf die Säurebeständigkeit der *Shigellen* zurückzuführen. Vor der Infektion der Darmschleimhaut muss zunächst das saure Milieu des Magens passiert werden. Dieser Vorgang ist für die *Shigella* möglich, weil das Bakterium während der stationären Wachstumsphase pH-Werte von bis zu 1.5 für mehrere Stunden überleben kann.^[12] Nach der Passage durch den Dünndarm, dringen die Bakterien in die Epithelzellen des terminalen Ileums und des Dickdarms ein und verursachen schwere Entzündungsreaktionen. Da *Shigellen* nicht in der Lage sind, von der apikalen Seite des Dickdarms in die Epithelzellen einzudringen, ist es zunächst notwendig, die Zellbarriere zu überwinden. Das Eindringen in die Darmschleimhaut erfolgt schließlich auf drei verschiedenen Arten (Abbildung 1.1).

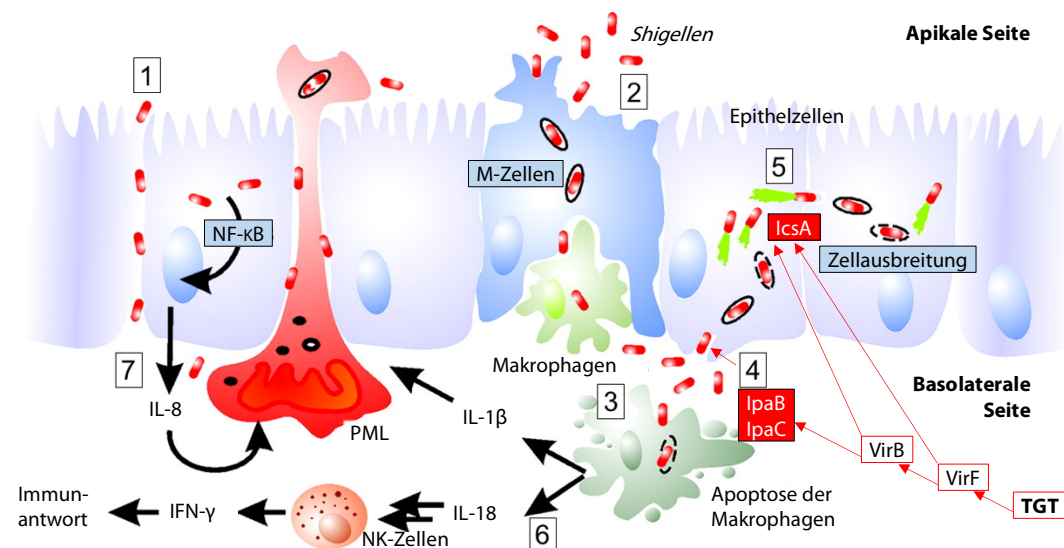


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Invasion von *S. flexneri* in die Epithelzellen des Dickdarms.^[13] (1) Invasion der *Shigellen* durch Manipulation der *tight junctions*. (2) Invasion über Transzytose durch M-Zellen und anschließende Aufnahme durch Makrophagen. (3) Induktion der Apoptose und Freisetzung in die Submukosa. (4) Infektion von Epithelzellen von der basolateralen Seite durch freie *Shigellen* in der Submukosa. (5) Infektion von Nachbarzellen. (6) Aktivierung einer antibakteriellen Immunantwort durch die Freisetzung von IL-18 durch Induktion der Apoptose der befallenen Makrophagen. (7) Freisetzung von IL-8 durch infizierte Zellen, die zusammen mit IL-1 β polymorphkernige Leukozyten (PML) rekrutieren.

Eine Möglichkeit ist die Manipulation der *tight junctions* zwischen den Epithelzellen durch Interaktion an der apikalen und basolateralen Position der Darmschleimhaut. Dies beeinflusst Regulationsmechanismen und induziert die Expression von *tight junction*-assoziierten Proteinen.^[14]

Shigellen durchqueren die Epithelzellbarriere auch über die M-Zell-Transzytose (*microfold cells*) und treffen auf anliegenden Makrophagen.^[15] Im eigentlichen Sinne handelt es sich bei M-Zellen um spezielle Epithelzellen, die fortlaufend Partikelproben aus dem Darmlumen an die darunter liegenden Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebe verteilen, wodurch Immunreaktionen initiiert werden können.^[16] Der natürliche Abbau durch Makrophagen wird umgangen, indem ein spontaner und apoptoseartiger Zelltod induziert wird, dem ein proinflammatorischer Signalweg durch die Zytokine IL-1 β und IL-18 folgt. Die Wirkung von IL-1 β löst eine Darmentzündung aus, die die charakteristische Wirkung der Bakterienruhr hervorruft. Die Effekte führen zum Verlust der epithelialen Zellbarrierefunktion, wodurch die Invasion weiterer *Shigellen* erleichtert wird.^[17] IL-18 hingegen ist an der Induktion einer antibakteriellen Immunantwort beteiligt. Infolgedessen wird die Produktion von IFN- γ durch die Aktivierung von natürlichen Killerzellen ausgelöst.^[13]

In der basolateralen Seite sind die *Shigellen* in der Lage, die Epithelzellen ohne den Einfluss von Makrophagen zu befallen und sich im Zytoplasma ungehindert zu vermehren. Zu diesem Zweck wird von den *Shigellen* ein Sekretionsapparat vom Typ-III mit Hilfe von Spa und Mxi gebildet, der an die Membran der Wirtszelle bindet. Der physikalische Kontakt des Apparats mit der Zellwand löst die Sekretion der Translokatorproteine IpaB und IpaC aus, wodurch eine Pore von etwa 25 Å gebildet wird, durch die weitere Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums in die Wirtszelle eingeschleust werden können.^[18,19] Darüber hinaus löst IpaC durch Aktivierung der Tyrosinkinase Src eine Signalkaskade aus, die zur aktinabhängigen Bildung von Filopodien und Lamellipodien führt, die den Sekretionsapparat und damit das gesamte *Shigella*-Bakterium umgeben, was zu seiner makropinozytotischen Aufnahme in die Epithelzelle führt. In der Folge kommt es zu einer massiven Umlagerung des Zytoskeletts, durch die das *Shigella*-Bakterium in einem makropinozytotischen Prozess in die Wirtszelle internalisiert wird.^[20] Zytoplasmatische *Shigella*-Bakterien können durch Polymerisation von Aktin mit Hilfe des Proteins IscA (VirG) benachbarte Epithelzellen erreichen. Die Lyse der benachbarten Epithelzellen wird ebenfalls durch IpaB und IpaC bewirkt. Dennoch erkennt das Nod1-vermittelte intrazelluläre Überwachungssystem Zellfragmente von *Shigellen* (Peptidoglykane), die den nukleären Transkriptionsfaktor κ B (NF- κ B) aktivieren.^[21,22] Dies bewirkt die Translation und Freisetzung des Chemokins IL-8, das zusammen mit dem proinflammatorischen IL-1 β polymorphonukleare Leukozyten (PML) rekrutiert. Im Gegensatz zu Makrophagen sind PML in der Lage, *Shigella*-Bakterien durch Phagozytose zu eliminieren. Andererseits wird gleichzeitig die Funktion der epithelialen Zellauskleidung reduziert, so dass die Bakterien unabhängig von M-Zellen die Submukosa erreichen können.^[13,23] Zusammen mit NK-Zellen und T-Lymphozyten, die von IL-18 rekrutiert werden, sind sie schließlich in der Lage, die *Shigellen* im befallenen Darm

vollständig auszuröten. Darüber hinaus fördert IL-18 die Produktion von Interferon IFN- γ , das wiederum das Immunsystem weiter stimuliert.

Abgesehen von den Schäden, die durch das Eindringen in Epithelzellen verursacht werden, hat *Shigella dysenteriae* Typ 1 die Fähigkeit, das so genannte Shiga-Toxin (Stx), ein AB₅-Toxin, zu produzieren. Neben dem produzierten Stx sind derzeit drei weitere AB₅-Toxine bekannt: das Cholera-Toxin (Ctx), das Pertussis-Toxin (Ptx) und das Subtilase-Toxin. Die hohe Toxizität von Stx resultiert aus seiner Fähigkeit, 28S-rRNA zu spalten und damit die Proteinbiosynthese zu hemmen. Dazu muss Stx zunächst an einen Glykosphingolipid-Rezeptor auf der Zellmembran binden und wird dann durch eine zelluläre Protease aktiviert.

1.2 tRNA-Guanin-Transglycosylase als Ziel in der Wirkstoffforschung

1.2.1 Rolle von VirF und tRNA-Guanin-Transglycosylase

Die Biosynthese der oben genannten Virulenzfaktoren und damit die Virulenz der *Shigellen* werden zentral durch die Transkriptionsfaktoren VirF und VirB gesteuert. Das verwendete Virulenzsystem, das auf einem 214 kbp-Plasmid kodiert ist, wurde in *S. flexneri* vollständig sequenziert.^[24] Während VirB an der Transkription von Pathogenitätsgenen (*mxi/spa* und *ipa*) beteiligt ist, trägt VirF indirekt zur Pathogenität bei, indem der Virulenzfaktor die Konzentration von VirB und die des IcsA-Proteins reguliert. Wie bereits erwähnt, ist das IcsA-Protein an der inter- und intrazellulären Ausbreitung von *Shigellen* beteiligt.

Die Regulation von VirF hängt von vielen Variablen wie Temperatur, pH-Wert, Osmolarität und der gegebenen Nährstoffsituation ab. Trotz optimaler Bedingungen (37 °C, pH 7.4, physiologische Osmolarität, freies Arginin und Methionin) hat sich gezeigt, dass die effektive Translation der VirF-mRNA zwei spezifische tRNA-Modifikationen erfordert. Gen-*Knock-out*-Experimente zeigen, dass es sich bei diesen Modifikationen um Queuosin in der *Wobble*-Position-34 und um 2-Methylthio-*N*6-isopentenyladenosin an Position-37 handeln. Eine Mutation an Position 37 im *miaA*-Gen bewirkt im Vergleich eine 10%ige Verringerung des VirF-Spiegels zum Wildtyp, kombiniert mit einer um 10 – 20% verringerten Hämolyse. Im Gegensatz dazu führt eine Mutation im *tgt*-Gen, welcher für den Austausch an Position 34 verantwortlich ist, zu einer Verringerung des VirF-Spiegels und zu einer Hämolyse um 50 – 60% im Vergleich zum Wildtyp.^[25–27]

Vor diesem Hintergrund ist die Hemmung dieser tRNA-modifizierenden Enzyme ein vielversprechender Weg, um die Pathogenität von *Shigellen* zu reduzieren. Die tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT, EC 2.4.2.29) aus dem Genprodukt des *tgt*-Gens aus *E.coli*, ist bereits umfassend charakterisiert worden.^[28] Schließlich wurden 1996 Kristallstrukturen von TGT aus dem Modellorganismus *Zymomonas mobilis* erhalten.^[29] Mit einer Sequenzidentität von 60.4%

sind sich die beiden orthologen Enzyme sehr ähnlich und unterscheiden sich im aktiven Zentrum nur an einer Position (Y106F; *Z. mobilis* TGT-Nummerierung) voneinander. Die *Z. mobilis* TGT ist ein leicht exprimierbares und kristallisierbares Protein, das die Grundlage für das strukturbasierte Wirkstoffdesign zur Entwicklung und Optimierung von TGT-Inhibitoren bildet.^[30–32]

1.2.2 Struktur der TGT von *Zymomonas mobilis*

Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur

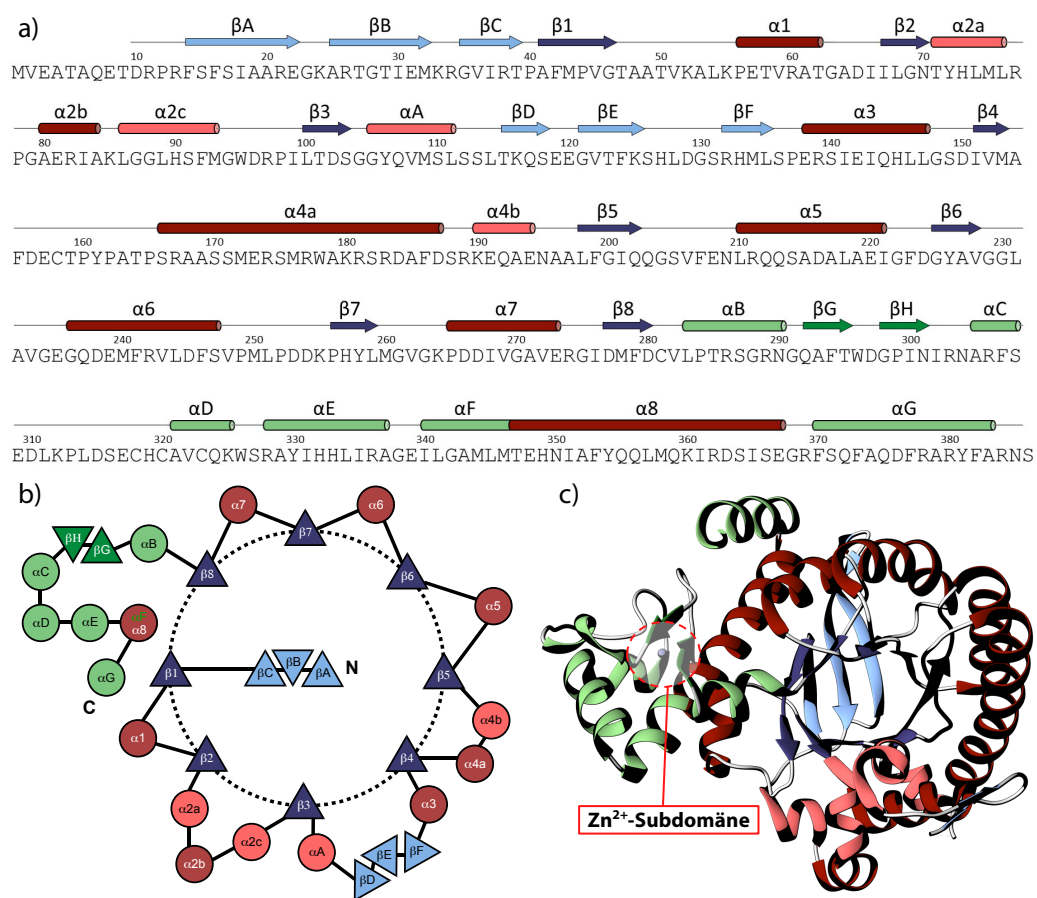


Abbildung 1.2 a) Primärsequenz der *Z. mobilis* TGT.^[33] b) Topologie-Diagramm der Sekundärstrukturelemente der *Z. mobilis* TGT.^[29] β -Faltblätter sind als Dreiecke und α -Helices als Kreise dargestellt. c) Röntgenkristallstruktur der TGT (PDB ID: 1P0D)^[34] ist entsprechend dem Topologie-Diagramm wiedergegeben. Die typischen $(\beta/\alpha)_8$ -TIM-barrel Motivelemente sind in dunkelrot (α -Helix) und dunkelblau (β -Faltblatt) dargestellt. Die Zink-Subdomäne ist in hell- (α -Helix) und dunkelgrün (β -Faltblatt) abgebildet. Die β 3- α 3-Insertion und das antiparallele dreisträngige β -Faltblatt Muster sind in hellblau dargestellt.

Die *Zymomonas mobilis* TGT ist ein Enzym mit einem Gewicht von etwa 43 kDa und 386 Aminosäuren (siehe Primärsequenz Abbildung 1.2a). Es enthält ein Zinkatom, das tetraedrisch

von drei Cysteinresten (Cys318, Cys320, Cys323) und einem Histidin (His349) koordiniert wird. Das Protein gehört zur Familie der $(\beta/\alpha)_8$ -Fass Enzyme (TIM-*barrel*-Proteine), deren Motiv erstmals in der Triosephosphat-Isomerase beobachtet wurde.^[35] Das Motiv besteht aus acht zylinderförmig angeordneten β -Faltblättern, an deren Außenseite acht α -Helices angebracht sind. Jedoch wird bei der *Z. mobilis* TGT das TIM-*barrel*-Motiv durch weitere Strukturelemente ergänzt (siehe Abbildung 1.2b und c).^[34] Zu diesen zusätzlichen Elementen gehören ein antiparalleles dreisträngiges β -Faltblattmuster, das sich am *N*-Terminus befindet, und eine $\beta 3$ - $\alpha 3$ Insertion. Zusammen mit der $\beta E \beta F$ -Schleife bildet die $\beta 3$ - $\alpha 3$ -Insertion ein essentielles Strukturelement zur Erkennung und Stabilisierung des tRNA Substrats.^[36]

Quartärstruktur

Die Mehrzahl der eukaryotischen TGTs bildet ein Heterodimer, das aus einer vermutlich 45 kDa regulatorischen Untereinheit und einer ebenso großen katalytischen Untereinheit besteht. Im Gegensatz dazu bilden prokaryotische TGTs Homodimere. Für die *Zymomonas mobilis* TGT konnte die Existenz eines TGT-Homodimers in Lösung durch kombinierte Untersuchungen von nativer nanoESI-Massenspektrometrie, gezielte Mutagenese, Enzymkinetik und Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen werden.^[37] Üblicherweise kristallisiert das Homodimer mit einer vergrabenen Kontaktfläche der beiden TGT-Monomere von etwa 1600 Å² (Dimer-Grenzfläche), in der Raumgruppe *C2*. Die Dimer-Grenzfläche wird durch eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und Van-der-Waals-Wechselwirkungen stabilisiert. Aufgrund der zweizähligen Drehachse des in der Kristallstruktur beobachteten Dimers, treten alle Wechselwirkungen doppelt auf.

Die dimere Struktur bleibt während der Komplexierung mit der tRNA intakt. Mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse konnte der Protein-tRNA-Komplex strukturell charakterisiert werden. Die Bindung der tRNA verhindert strukturell die Bildung einer zweizähligen Achse, wodurch die Packung der Moleküle von der Raumgruppe *C2* nach *I4* wechselt (PDB-Codes: 1Q2S und 1Q2R).^[33] Darüber hinaus wurde mittels nativer Massenspektrometrie gezeigt, dass die Bindung zwischen tRNA und TGT ein Verhältnis von 1:2 aufweist, was sich ebenfalls in der Kristallstruktur widerspiegelt. Dabei bindet die tRNA einerseits an das aktive Zentrum eines TGT-Monomers, welchen den Basenaustausch durchführt, während das zweite TGT-Monomer den Dimer-tRNA-Komplex über die $\beta 3$ - $\alpha 3$ -Schleife stabilisiert.^[33,36,37]

Überprüfungen der dimeren Stabilität ergaben, dass insbesondere zwei Strukturelemente, bestehend aus der $\beta 1 \alpha 1$ -Schleife und einem sogenannten aromatischen *Hot Spot* (Trp326, Tyr330, His333 und Phe92'), signifikant zur Stabilität beitragen (siehe auch **Kapitel 5**).^[37–40]

Die kompetitive Hemmung durch Bindung von Liganden im aktiven Zentrum zeigt in gewissen Fällen einen allosterischen Effekt auf die genannten Strukturelemente, der die dimere Form destabilisiert. Durch Störung der $\beta 1 \alpha 1$ -Schleife und des aromatischen *Hot Spots* konnte eine

erhöhte TGT-Monomerkonzentration mit nativer nanoESI-MS verfolgt werden, auch wenn die Bindung des Liganden an das Enzym kristallographisch eine dimere Form aufwies.^[40] Studien, die sich ebenfalls mit der Destabilisierung des TGT-Dimers befassen, zeigen in drei Fällen eine alternativ "verdrehte" Konformation des Dimers, bei der eine physiologische Funktion aus strukturellen Gründen ausgeschlossen wird (siehe auch **Kapitel 2**).^[41]

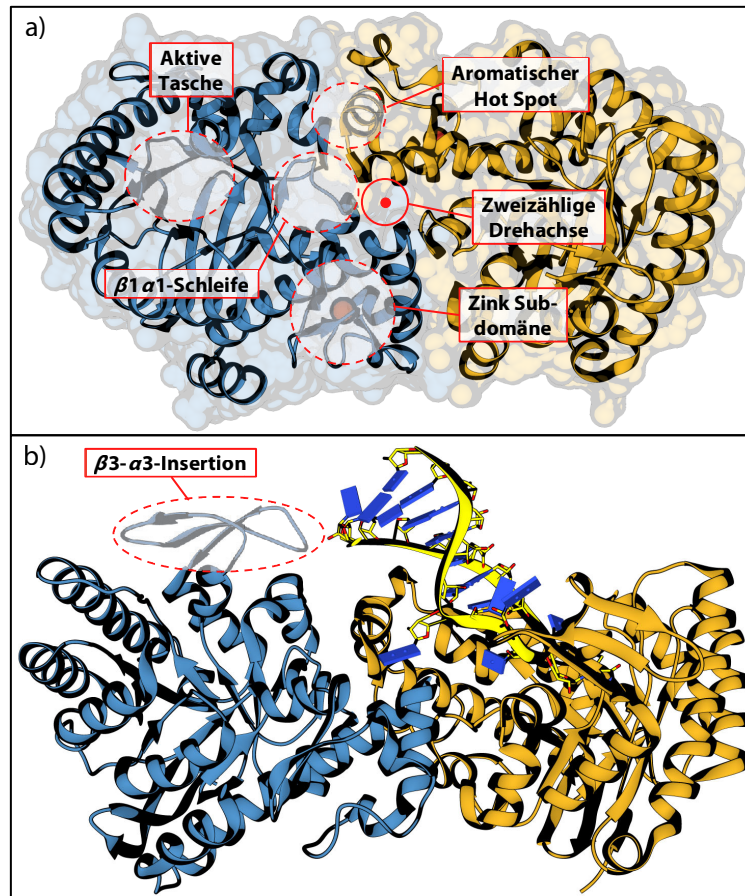


Abbildung 1.3 a) Darstellung der *Z. mobilis* TGT in der konventionellen dimeren Form der TGT (PDB Code: 1POD).^[34] Das Dimer befindet sich auf einer kristallographisch zweizähligen Drehachse, wodurch alle Strukturelemente zweifach im Dimer erscheinen. Die Zink-Ionen sind als rote Kugeln dargestellt. **b)** TGT-Homodimer im Komplex mit tRNA (PDB Code: 1Q2S).^[33]

Aktives Zentrum

Im Bereich der β -strängigen Region am C-Terminus des TIM-*barrel*-Motivs befindet sich das aktive Zentrum des Proteins. Zur Bindung der tRNA in die aktive Tasche können insgesamt drei Bindungstaschen im Enzym identifiziert werden (Abbildung 1.4).

Die Haupttasche besteht aus der Guanin/preQ₁-34-Bindetasche, in der die Basenaustauschreaktion stattfindet. Die Guanin-Base wird innerhalb der Tasche durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Asp102, Asp156, Gln203, Gly230, Leu231 und Ala232 gebunden. Dabei wird die

Base zwischen Met260 und Tyr106 eingebettet. Wie bereits beschrieben handelt es sich bei Tyr106 um die einzige Aminosäure im aktiven Zentrum, die sich zwischen der *Z. mobilis* und *S. flexneri* TGT unterscheidet.^[42] Anstelle von Tyrosin findet sich an dieser Stelle ein Phenylalanin wieder. Die Bindung des Substrats in die Bindungstasche induziert einen *induced fit* Vorgang, durch den die Peptidbindung zwischen Leu231 und Ala232 umgeklappt wird, wodurch die endgültigen Bindungseigenschaften der Guanin/PreQ₁-34-Bindungstasche entstehen.^[34]

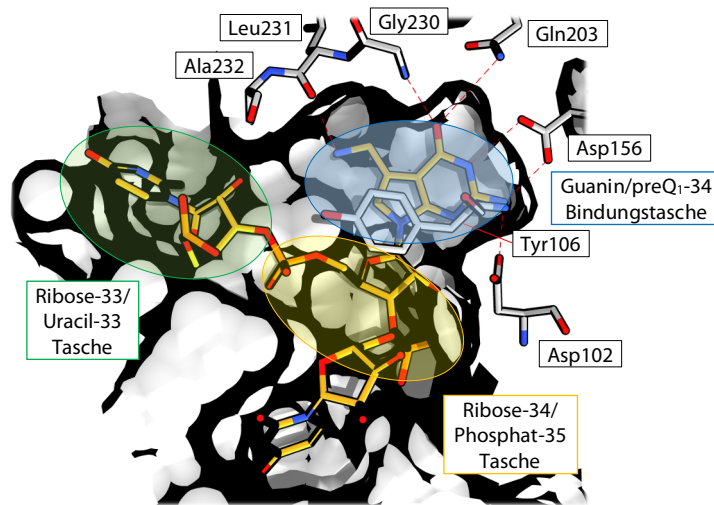


Abbildung 1.4 Aktives Zentrum von *Z. mobilis* TGT (C_{grau}), besetzt durch das preQ₁-Substrat der tRNA (C_{gelb}, PDB Code: 1Q2S)^[33]. Die Proteinoberfläche ist in grau dargestellt. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau, P = orange.

Angrenzend befinden sich die Ribose-33/Uracil-33- und Ribose-34/Phosphat-35-Taschen. Erstere ist eine lösungsmittel-exponierte, schalenförmige Bindungstasche, die durch die Aminosäuren Ala232, Gly261 bis Lys264, Asp267, Cys281 bis Leu283 und Arg286 gebildet wird. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Ribose-34/Phosphat-35-Tasche um eine tief vergrabene Tasche. Die Struktur besteht aus einem hydrophoben Boden aus den Aminosäuren Val45, Leu68 und Val282, während Thr47, Asn70 und Gln107 den verbleibenden Teil der Tasche bilden. Der hydrophile Eingang wird durch die Aminosäuren Asp102 und Asp280 gebildet, wobei Asp280 auch an der Interaktion mit dem Guanin-Substrat der tRNA beteiligt ist. Alle drei Taschen zusammen sind in der Lage die Sequenz U33G34U35 als Substrat zu erkennen und in Folge zu binden.^{[28][43]}

Innerhalb des strukturbasierten Wirkstoffdesigns ist eine Ausdehnung des Liganden in Richtung der Ribose-33/Uracil-33- und Ribose-34/Phosphat-35-Taschen, basierend auf der Adressierung der Guanin/preQ₁-34-Bindungstasche, möglich.

1.2.3 Biosynthese von Queuin in Prokaryoten

In der Mehrzahl der Bakterien und Eukaryonten wird die Anticodon-*Wobble*-Position (34) der tRNA^{Asp}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Tyr} und tRNA^{His} von der hochmodifizierten Nukleobase Queuosin besetzt, die an der Feinabstimmung der Translationsgenauigkeit, sowie -geschwindigkeit beteiligt ist.^[44,45] Die TGT katalysiert den positionsspezifischen Austausch eines Guanins in bestimmten tRNAs durch ein 7-substituiertes 7-Deazaguanin-Derivat.^[36] Die archaebakterielle TGT ersetzt in Position 15 das Guanin durch die prämodifizierte preQ₀-Base, welche in fortlaufenden Reaktionen zu Archaeosin umgesetzt wird.^[46] Die eukaryotische TGT katalysiert den Austausch von Guanin an Position 34 auf dem Anticodon der Asn-, Asp-, His- und Tyr-spezifischen tRNAs gegen das hypermodifizierte Queuosin. Im Falle der bakteriellen TGT wird das Guanin durch das vormodifizierte preQ₁ ersetzt, das durch Reaktionen mit den Enzymen QueA und QueG weiter Zielprodukt umgewandelt wird (Abbildung 1.5).

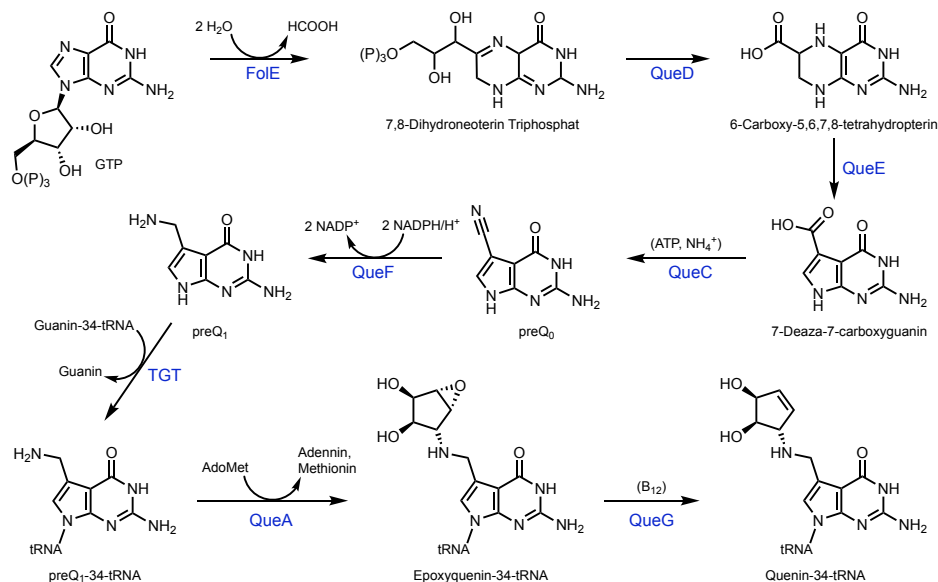


Abbildung 1.5 Biosynthese der modifizierten tRNA Base Queuine.^[47] Substrate und Kosubstrate: GTP, Guanosin 5'-Triphosphat; AdoMet, S-Adenosylmethionin; B₁₂, Coenzym B₁₂; preQ₀, 7-Cyano-7-deazaguanin; preQ₁, 7-Aminomethyl-7-deazaguanin; Enzyme: FoIE, GTP Cyclohydrolase I; QueD, 6-Carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin Synthase; QueE, 7-Carboxy-7-deazaguanin Synthase; QueC, preQ₀ Synthetase; QueF, preQ₀ Reduktase; TGT, tRNA-Guanin-Transglycosylase; QueA, S-Adenosylmethionin:tRNA Ribosyltransferase Isomerase; QueG, Epoxyqueuosin Reduktase.

Anfänglich katalysiert die GTP Cyclohydrolase I (FoIE) die Umwandlung von GTP zu 7,8-Dihydroneopterin Triphosphat, welches ebenfalls der erste Schritt in der Biosynthese von Tetrahydrofolat darstellt.^[57] Weitere biokatalytische Schritte durch 6-Carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin Synthase (QueD), 7-Carboxy-7-deazaguanin Synthase (QueE), preQ₀ Synthase (QueC) und preQ₀ Reduktase (QueF) wandeln 7,8-Dihydroneopterin Triphosphat zu 7-(Aminomethyl)-7-deazaguanin um, welches auch als preQ₁ bezeichnet wird.^[49–51] Das als

kodiert betrachtete Guanin (preQ_1) wird als Vorläufer durch Katalyse des Enzyms tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT) in die 34-Position der oben genannten tRNAs eingefügt. Darauffolgend wird auf tRNA Ebene eine 2,3-Epoxy-4,5-dihydroxycyclopentyl Einheit an die exocyclische Aminomethyl-Gruppe durch die S-Adenosylmethionin:tRNA Ribosyltransferase Isomerase (QueA) angefügt, die zur Bildung des tRNA-Nukleosids Epoxyqueuosins (oQ) führt.^[52,53] Im finalen Schritt wird die Epoxy-Funktion von oQ durch die Epoxyqueuosin Reduktase (QueG) auf eine Doppelbindung reduziert, was zum Queuine Nukleotid Queuosin (Q) führt.^[54,55]

1.2.4 TGT katalysierte Basenaustauschreaktion

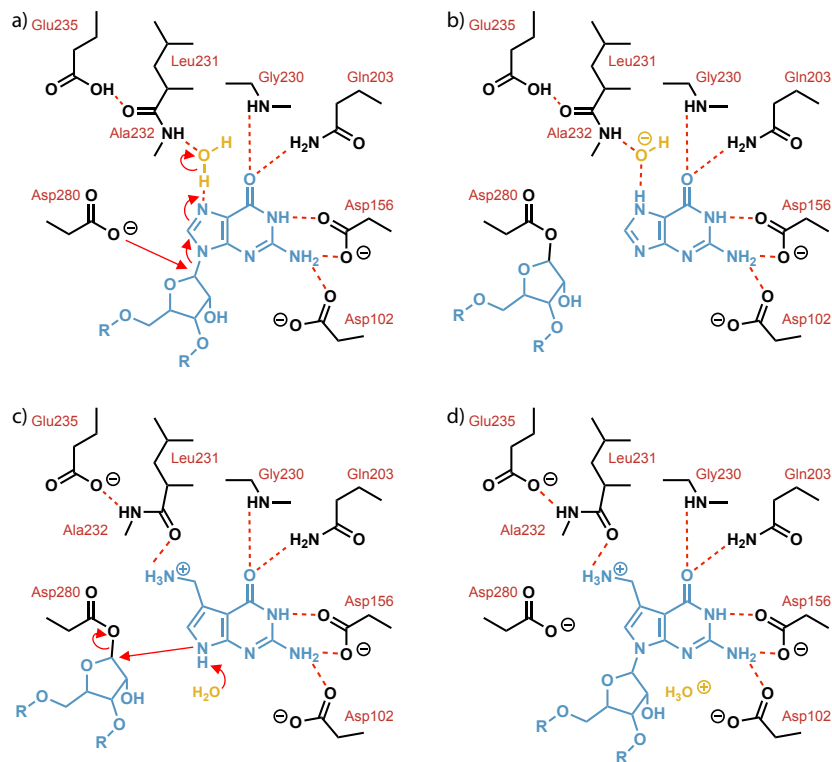


Abbildung 1.6 Katalysierter Basenaustausch der bakteriellen TGT. **a)/b)** Die glykosidische Bindung von Guanosin-34 wird durch einen nukleophilen Angriff gespalten, wodurch ein kovalentes TGT-tRNA-Zwischenprodukt entsteht. **c)/d)** preQ_1 wird ebenfalls durch einen nukleophilen Angriff eingebaut. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Aus Übersichtsgründen wird die Vernetzung zu benachbarten Basen mit R abgekürzt.^[47]

Der Basenaustausch von Guanin in der *wobbel*-Position-34 der tRNAs^{Asn, Asp, His, Tyr} gegen die modifizierte Base preQ_1 verläuft nach einem irreversiblen Ping-Pong-Mechanismus.^[33,47] Als erstes bindet die tRNA an das aktive Zentrum der TGT, wo Asp280 zunächst nukleophil das C(1) von Ribose-34 angreift (Abbildung 1.6a), so dass ein kovalentes TGT-tRNA-Zwischenprodukt entsteht (Abbildung 1.6b). Das gesplattene Guanin verlässt die Bindungstasche nach

Aufnahme eines Protons aus einem Wassermolekül, das durch Ala232 gebunden wird. Eine Rückübertragung des Protons an das erwähnte Wassermolekül wird ausgeschlossen, wodurch die Reaktion irreversibel erscheint. Durch die Bildung von Oxonium-Ionen im späteren Verlauf (Abbildung 1.6d) neutralisieren sich beide Ionen gegenseitig, so dass sie aus dem Gleichgewicht entzogen werden. Der Eintritt von preQ_1 in die unbesetzte Bindungstasche induziert anschließend ein Umklappen des Peptidrückgrates an der Amidbindung zwischen Leu231 und Ala232 (*induced fit*), bei der nun die Donorfunktion (C=O) anstelle der Akzeptorfunktion (NH) in die Tasche hineinragt. Die neu angepasste Anordnung im aktiven Zentrum wird durch die benachbarte Aminosäure Glu235 stabilisiert, die vor Bindung von preQ_1 mit der Carbonylgruppe von Leu231 wechselwirkte. Die exozyklische Aminofunktion von preQ_1 verdrängt das zuvor beschriebene Wassermolekül/Hydroxidion innerhalb der aktiven Tasche und bildet nun eine Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe von Leu231. Katalysiert durch ein Wassermolekül, greift ausgehend von N(9) von preQ_1 nukleophil die Ribose-Gruppe des ehemaligen Guanins an (Abbildung 1.6c) und vollendet den Austauschprozess. Das an die tRNA kovalent gebundene preQ_1 wird anschließend freigesetzt (Abbildung 1.6d), wodurch der Austauschprozess abgeschlossen ist.

1.3 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene physikochemische Aspekte mit Hilfe des strukturbasierten Wirkstoffdesigns auf der Basis von Liganden der *Z. mobilis* TGT analysiert. Ein wesentlicher Teil der Arbeit richtet sich auf die Analyse einer neuen Packungsform des Homodimers, die gegenüber der bekannten, katalytisch aktiven Form "verdreht" ist. Dieses Dimer wird in Lösung durch Einführung einer Sonde in das Protein strukturell untersucht. Darüber hinaus wurde eine Wasserstruktur in einer angrenzenden Bindungstasche des aktiven Zentrums mittels thermodynamischer Untersuchungen, unterstützt durch Röntgenkristallstrukturanalyse, auf den Einfluss von strukturbasierten Liganden charakterisiert. Zusätzlich wurden kovalent bindende Liganden an eine TGT-Mutante verwendet, um die Eigenschaften der Dimer-Grenzfläche aufzuklären. Zuletzt wurden Mutationsstudien zu stabilitätsgebenden Strukturelementen an aromatischen Aminosäuren durchgeführt. Im Einzelnen werden folgende vier Aspekte behandelt:

Kapitel 2: Basierend auf drei C(4')-modifizierten *lin*-Benzoguanin-Liganden, die die Protein-Protein-Wechselwirkung des Homodimers stören und so das Protein kristallographisch in ein "verdrehtes" (*twisted dimer*), potentiell katalytisch inaktives Dimer umwandeln, wurde das Protein mit einer Fluorsonde exprimiert, um das dynamische Gleichgewicht in Lösung während der Ligandentitration mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie zu untersuchen.

Kapitel 3: Mit Monosaccharid-basierten *lin*-Benzoguanin-Liganden wurden ladungsneutral Wassermoleküle innerhalb der Ribose-33/Uracil-33-Tasche verdrängt. Insbesondere die Acetonid-geschützten Zuckerreste zeigen durch ihre hydrophobe Oberfläche eine Stabilisierung eines trizyklischen [5+5+4] Wasserclusters, was sich signifikant in den thermodynamischen Signaturen und Bindungsmodi widerspiegelt.

Kapitel 4: Im Rahmen eines *Tethering*-Projekts wurde Cys330 in TGT C158S/C281S/Y330C/H333A als Anker für die Reaktion mit verschiedenen Liganden einschließlich Thiol-, Bromalkylamid- und Acrylamid-Liganden verwendet, um die Dimer-Grenzfläche freizulegen und kristallographisch zu analysieren.

Kapitel 5: Die Abhängigkeit der aromatischen Aminosäuren sowohl innerhalb des aromatischen *Hot Spots* als auch in der Nähe des Schleifen-Helix-Motivs konnte in einer Mutationsstudie zur Stabilität der Dimerbildung durch Beeinträchtigung des oben genannten Motivs abgeleitet werden und lässt vermuten, dass die Dimer-Anordnung durch Beeinflussung des Schleifen-Helix-Motivs mittels Liganden moduliert werden kann.

2

Kapitel 2

¹⁹F-NMR enthüllt ligandinduzierte Konformationsänderungen bei Homodimer-Kontakten der tRNA-Guanin-Transglycosylase

¹⁹F NMR Unveils Conformational Changes at Homodimer Contacts of tRNA-Guanine Transglycosylase

A. NGUYEN¹, G. GEMMECKER², C. SOFTLY², L. D. MOVSIKYAN³, T. PFAFFENEDER³,
L. J. BARANDUN³, J. KALIM³, A. HEINE¹, F. DIEDERICH³, M. SATTLER², G. KLEBE¹

¹Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg,
Marbacher Weg 6–10, D-35037 Marburg, Deutschland

²Lehrstuhl für Biomolekulare NMR-Spektroskopie, TU München,
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching, Deutschland

³Laboratorium für Organische Chemie, ETH Zürich,
Vladimir-Prelog-Weg 3, HCI, 8093 Zürich, Schweiz

2.1 Vorwort

Dieses Projekt wurde in Kooperation mit PD DR. GERD GEMMECKER und CHARLOTTE SOFTLEY (Arbeitsgruppe PROF. DR. MICHAEL SATTLER, Technische Universität München, Deutschland) ausgearbeitet. ^{19}F -NMR-Messungen wurden von PD DR. GERD GEMMECKER und CHARLOTTE SOFTLEY durchgeführt. Die Reinigung verschiedener fluormarkierter Proteine, sowie ihre biophysikalische Analyse mittels Röntgenkristallographie wurden vom Autor dieser Arbeit durchgeführt. Die vorgestellten Verbindungen **2.1** - **2.8** wurden von den Mitarbeitern um PROF. DR. FRANÇOIS DIEDERICH (Arbeitsgruppe PROF. DR. FRANÇOIS DIEDERICH, ETH Zürich, Schweiz) hergestellt. Massenspektrometrische Analysen wurden von der Serviceabteilung der Chemie (Marburg) unter der Leitung von DR. UWE LINNE durchgeführt.

2.2 Kurzfassung

Die tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT) erkennt die tRNA als Homodimer und führt an der *Wobble*-Position einen vollständigen Nukleobasenaustausch durch. Verwendete Inhibitoren besetzen die aktive Bindungstasche und blockieren die Enzymfunktion, indem sie die tRNA kompetitiv ersetzen. Neue Studien haben gezeigt, dass bestimmte Inhibitoren das als Homodimer vorliegende Protein in einen "verdrehten" Zustand versetzen, in dem eine Monomereinheit um 130° zur anderen gedreht wird. In dieser neuartigen Geometrie ist das Enzym nicht mehr in der Lage, die tRNA zu binden und katalytisch umzusetzen. Die "verdrehte" Dimeranordnung kristallisiert unter den identischen Bedingungen Seite an Seite mit der üblichen, katalytisch aktiven Form während des Kristallisationsprozesses. Durch Einführung einer Fluorsonde wurde der Rotationsprozess in Lösung unter nativen Bedingungen mit Hilfe von ^{19}F -NMR-Spektroskopie analysiert. Es ist möglich, dass die "verdrehte" Form eine funktional regulierte Anordnung des Proteins darstellt, die eine Art Ruhezustand repräsentiert.

2.3 Einleitung

2.3.1 Das verdrehte Homodimer

In früheren Studien wurde berichtet, dass die tRNA-modifizierende TGT die Katalyse nur im homodimeren Zustand durchführen kann.^[36,37,56] Erst in diesem Zustand erkennt das Enzym die tRNA und bindet sie im Verhältnis 2:1, im Folge wird dann an der *Wobble*-Position der tRNA eine vollständige Nukleobasenaustauschreaktion katalysiert.^[33] Auch wenn beide monomere Untereinheiten des Homodimers katalytisch kompetent sind, kann nur das intakte Dimer ein einziges tRNA-Molekül binden und eines seiner beiden aktiven Zentren für die Enzymreaktion zur Katalyse nutzen. Die zweite Untereinheit unterstützt die Substraterkennung und richtet die tRNA optimal zum Enzym aus, indem sie über eine polare Wechselwirkung mit der $\beta E\beta F$ -Schleife auf dem Rückgrat der tRNA interagiert und sie dadurch auf dem Enzym stabilisiert (Abbildung 1.3b).

Die Basenaustauschreaktion findet in der tief vergrabenen Tasche der Ribose-34 statt. Viele der *lin*-Benzoguanin-Liganden, die in der Vergangenheit entwickelt wurden, adressieren diese Tasche, die sich unmittelbar an der Dimer-Grenzfläche befindet. Insbesondere die hydrophoben Reste Val45, Leu68 und Val282, die Bestandteil des unteren Endes der Ribose-34-Tasche sind, reagieren empfindlich auf Wechselwirkungen mit funktionellen Gruppen, die an das *lin*-Benzoguanin-Gerüst angebracht sind.^[57] Infolgedessen werden durch die eingesetzten

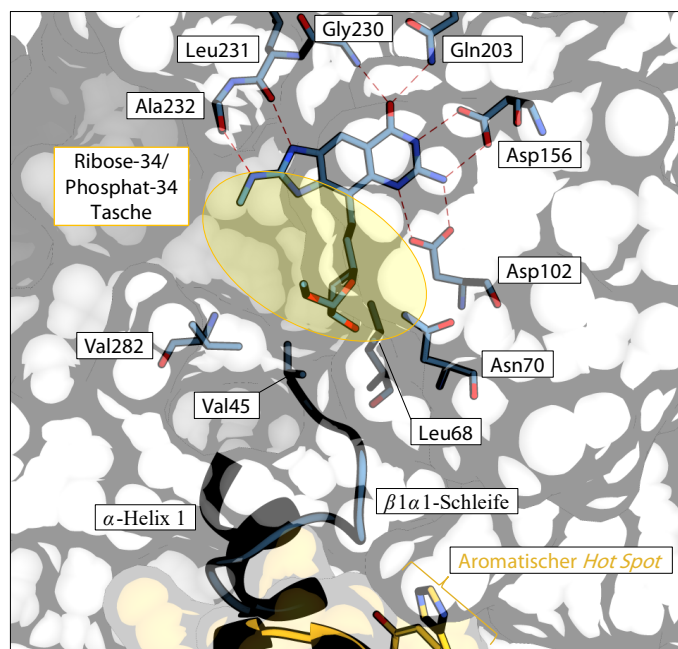


Abbildung 2.1 Darstellung des aktiven Zentrums in *Z. mobilis* TGT in Komplex mit einem exemplarischen Liganden (C_{blau}, Oberfläche_{grau}, PDB Code: 6YHD) zur Adressierung der Ribose-34-Tasche. Das Schleifen-Helixmotiv, bestehend aus α -Helix 1 und $\beta 1\alpha 1$ -Schleife ist als Bändermodell dargestellt. Ein ausgewählter Bereich des zweiten Monomers des Homodimers ist in gelb mit Andeutung des aromatischen *Hot Spots* abgebildet. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau.

Inhibitoren bemerkenswerte strukturelle Störungen am Schleifen-Helix-Motiv (Thr47 – Thr62) induziert. Leichte Veränderungen in der Quartärstruktur sind aufgrund des vollständigen Zerfalls des Motivs zu beobachten (siehe auch dazu **Kapitel 5**). Das Motiv schützt den aromatischen *Hot Spot* (Trp326, Tyr330, His333 und Phe92'), der in der Mitte eines typischen O-Ring-Motivs eingebettet ist, vor dem Zugang zum Lösungsmittel.^[38] Mutationsstudien zeigen, dass die Integrität der räumlichen Anordnung der vier aromatischen Aminosäuren als essentiell für die Stabilität der Dimer-Grenzfläche angesehen wird.^[38,39] Das Monomer-Dimer-Gleichgewicht wird durch Destabilisierung des Schleifen-Helix-Motivs und des aromatischen Clusters zunehmend in den monomeren Zustand verschoben. Dieser Befund wird durch die Tatsache verstärkt, dass umgekehrt die Erhöhung der Proteinkonzentration das Gleichgewicht wieder in Richtung des Dimers verschiebt. Dadurch wird das Protein während der Kristallisation in den Dimerzustand angereichert und findet sich als Homodimer trotz möglicher Störungen der Grenzfläche ausschließlich mit der C_2 -Symmetrie in den Kristallstrukturen wieder.

Drei Liganden wurden identifiziert, die im gebundenen Zustand wahrscheinlich die Grenzfläche stören bzw. stabilisieren, so dass eine völlig neuartige und abweichende Dimer-Grenzfläche mit verdrehter Anordnung der Monomereinheiten induziert wird (Abbildung 2.2). Die neu geformte Dimeranordnung konnte durch Kokristallisation strukturell analysiert werden (Abbildung 2.3).^[41,57]

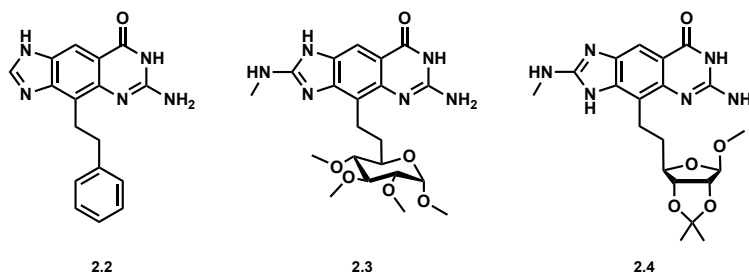


Abbildung 2.2 Strukturen der Liganden **2.2** – **2.4** zur Adressierung der Ribose-34-Tasche. Röntgenkristallographische Analyse der Liganden in Komplex mit TGT wurden in der funktionalen Packungsform C_2 und in der inaktiven Form in $P2_1$ Seite an Seite im gleichen Kristallisationsansatz gefunden.

Mit Änderung der Dimeranordnung wird die Packung der Moleküle im Kristallverband verändert, so dass die Raumgruppe von C_2 zu $P2_1$ wechselt. Die neuartige Grenzfläche des "verdrehten" Dimers erstreckt sich beinahe über die gleiche Fläche, die in der üblichen C_2 -Kristallpackung des tRNA-bindenden Homodimers gebildet wird (Abbildung 2.3b). Ein Vergleich der auftretenden Wechselwirkungen beider Grenzflächen zeigt sich mit sehr ähnlicher Bilanz. Die Verdrehung besteht aus einer Rotation um 130° , indem die beiden monomeren Untereinheiten relativ zueinander gedreht werden. Im Gegensatz zur kohärenten Grenzfläche des funktionalen Dimers erstreckt sich die gemeinsame Oberfläche im

"verdrehen" Zustand über vier nicht zusammenhängende Abschnitte zwischen den Monomeren. Nichtsdestotrotz zeigt die "verdrehte" Spezies eine ähnliche Anhäufung von aromatischen Resten. Während Trp326, Tyr330 und His333 sich auf der α -Helix E befinden und durch Phe92' am Dimerpartner an der α -Helix 2c vervollständigt werden (Abbildung 2.3c), ersetzt Tyr72' (α -Helix 2a) Phe92' in der "verdrehten" Anordnung im aromatischen *Hot Spot* (Abbildung 2.3d). Auffällig ist die "verdrehte" Anordnung von Trp326 um 180° nach Bindung der Liganden 2.2 – 2.4 in der Packung der Dimere in den Raumgruppen $C2$ und $P2_1$. Vor allem ist das "verdrehte" Homodimer aus geometrischen Gründen nicht in der Lage, die tRNA zu erkennen und somit eine Basenaustauschreaktion zu katalysieren. Da beide Kristallpackungen nebeneinander unter gleichen Kristallisationsbedingungen wachsen, liegt der energetische Zustand beider Formen in einem ähnlichen Bereich vor. Im Allgemeinen ist das Kristallwachstum ein Prozess, der sich über mehrere Tage erstreckt und durch die Einstellung des Gleichgewichts in der Kristallisationslösung gebildet wird. Unter diesem Gesichtspunkt ist ein

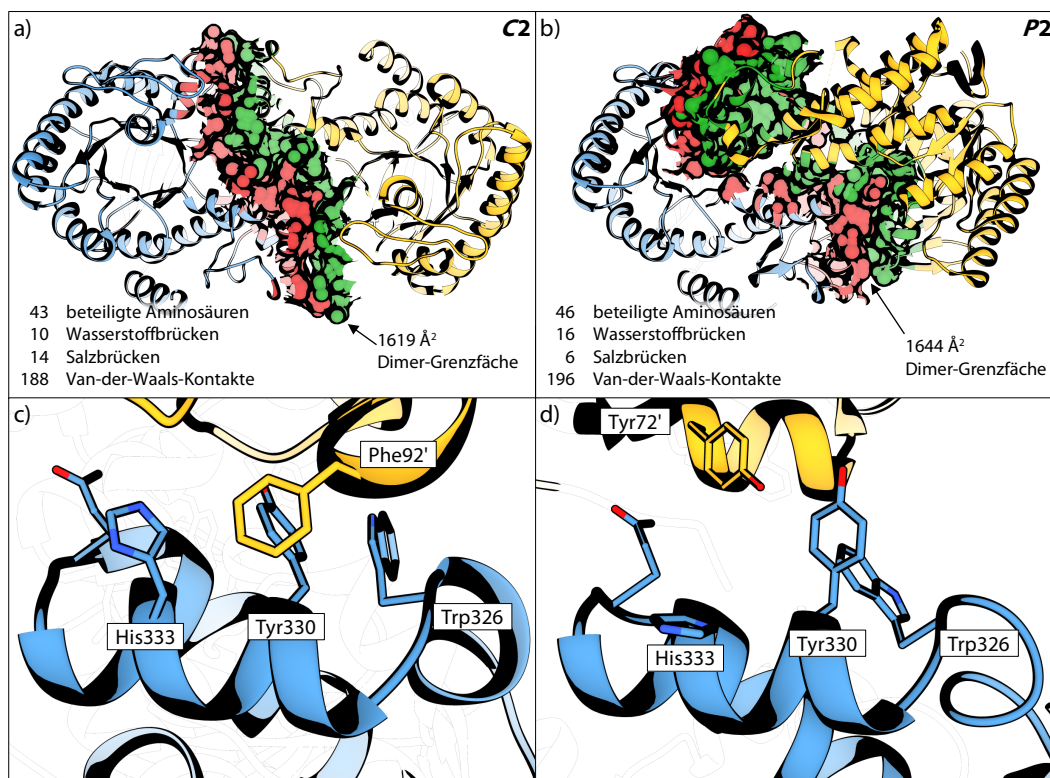


Abbildung 2.3 Vergleich der Anordnung im funktionalen **a)** Raumgruppe: $C2$, PDB Code: 1PUD)^[32] und verdrehten **b)** Raumgruppe: $P2_1$, PDB Code: 5I07)^[41] Homodimer der TGT. Durch Rotation der beiden monomeren Untereinheiten um etwa 130° ist das verdrehte Dimer aus sterischen Gründen nicht mehr in der Lage, die tRNA zu erkennen. Beide Dimer-Grenzflächen unterscheiden sich wenig in der Größe der gemeinsam genutzten Schnittstelle. Das funktionale Dimer bildet jedoch eine zusammenhängende Grenzfläche, während in der verdrehten Form die Grenzfläche aus vier einzelnen Flecken gebildet wird. Zusätzlich zu den aromatischen Aminosäuren Trp326, Tyr330 und His333 werden die aromatischen Cluster, die zur Stabilität des Dimers beitragen, durch **c)** Phe92' im funktionalen und **d)** Tyr72' im verdrehten Dimer ergänzt.

Designkonzept, das die Stabilisierung des "verdrehten" Zustandes zum Ziel hat, eine alternative Möglichkeit, die Katalysefähigkeit des Enzyms zu hemmen.

Spekulativ wird angenommen, dass die Regulierung der katalytischen Aktivität an der TGT mit Störungen am Schleifen-Helix-Motiv zusammenhängt, das die Konzentration der verfügbaren funktionalen Dimere steuert. Vermutlich induziert der gebundene Ligand den "verdrehten" Zustand bzw. stabilisiert das "verdrehte" nicht-funktionale Homodimer. Möglicherweise besteht sogar ein natürlicher Ligand, der diese Steuerung vornimmt bzw. beeinflusst. In der neuen Kristallpackung nimmt das Schleifen-Helix-Motiv einen ungeordneten Verlauf an und trägt nicht mehr zu Stabilität des Proteins bei. Zudem ist das Enzym im neuen Zustand nicht mehr in der Lage seiner katalytischen Aktivität nachzukommen. Zuvor entworfene Liganden, die das untere Ende der Ribose-34-Tasche adressieren, zeigten bereits, dass die strukturellen Eigenschaften des Schleifen-Helix-Motivs empfindlich auf geringfügige Modifikationen am Liganden reagieren.^[57] Es wird aufgrund der Tatsache, dass beide Kristallformen nebeneinander kristallisieren, angenommen, dass sie energetisch nahe beieinander liegen und gemeinsam in Lösung im Gleichgewicht existieren.

2.3.2 Proteinbeobachtete ^{19}F -NMR

In diesem Projekt wurde die proteinbeobachtete ^{19}F -NMR (*Protein-observed* ^{19}F NMR, ProF-NMR) angewandt, um den ligandinduzierten Prozess zur Bildung des "verdrehten" Dimers im nativen Zustand in Lösung zu untersuchen (Abschnitt 2.3.1). Im Allgemeinen trägt eine Kohlenstoff-Fluor-Bindung wesentlich zur metabolischen Stabilität bei und erscheint daher in vielen Arzneimittelmolekülen. Seit 2007 enthalten 20% der von der FDA (*Food and Drug Administration*) zugelassenen Medikamente Fluor und diese Zahl steigt mit verbesserten synthetischen Methoden zum Einbau von Fluor in Moleküle weiter an.^[58] Darüber hinaus können Fluoratomen sowohl an hydrophoben als auch an dipolaren Wechselwirkungen, insbesondere mit Carbonylgruppen^[59] teilhaben und können zur Abstimmung der Azidität^[59] oder Lipophilie für die Membranpermeabilität verwendet werden.^[60] Diese Eigenschaften machen Fluor zu einem wertvollen Ersatz für Wasserstoffatome in der medizinischen Chemie.

Die Nutzung von ^{19}F -Kernen in der biomolekularen Kernspinresonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR) birgt mehrere vorteilhafte Eigenschaften. Kovalent gebundenes Fluor hat einen Van-der-Waals-Radius von 1.47 Å, der sich nur geringfügig von dem Van-der-Waals-Radius des Wasserstoffs von 1.20 Å unterscheidet, so dass die Fluoreinlagerung nur geringe Störungen in der Struktur des Proteins verursacht. Insbesondere das hohe gyromagnetische Verhältnis spiegelt eine gute Nachweisempfindlichkeit im Rahmen der NMR-Spektroskopie wider, wodurch der ^{19}F -Kern zu 83% so empfindlich wie ein ^1H -Kern und damit insgesamt der zweitempfindlichste stabile NMR-aktive Kern ist.^[61] Im Gegensatz zu ^1H -NMR kann aufgrund

des Fehlens von Fluor in üblichen Puffern, Detergenzien und natürlich vorkommenden Biopolymeren der experimentelle Aufbau für die ProF-NMR schnell und ohne die Notwendigkeit einer Unterdrückung des Hintergrundsignals durchgeführt werden. Hierdurch ist ein breites Spektrum von Lösungsmitteln nutzbar.^[62] Ein hilfreiches Merkmal ist ein weiter beobachtbarer chemischer Verschiebungsbereich der fluorierten funktionellen Gruppen. Dies deutet auf die Reaktionsfähigkeit des Fluorkerns auf subtile Veränderungen in der chemischen Umgebung hin (Abbildung 2.4). ProF-NMR mit ^{19}F -markierten Aminosäuren erzeugt relativ einfache Spektren, die dynamische Strukturinformationen zum Verständnis der Proteinfaltung und -funktion liefern können. Veränderungen in diesen Spektren nach Zugabe von Fragmentmolekülen können beobachtet und quantifiziert werden. Anwendung fand die ProF-NMR unter anderem zur klassischen Liganden-Entdeckung,^[63] Antikörper-Antigen-Interaktion^[64] und zur Beobachtung von Konformationsänderung nach Ligandbindung^[65]. Daher stellt die Fluormarkierung einen vielversprechenden Ansatz zur Untersuchung von Proteinen in ihrer nativen Umgebung durch effiziente Unterdrückung von Hintergrundsignalen dar.

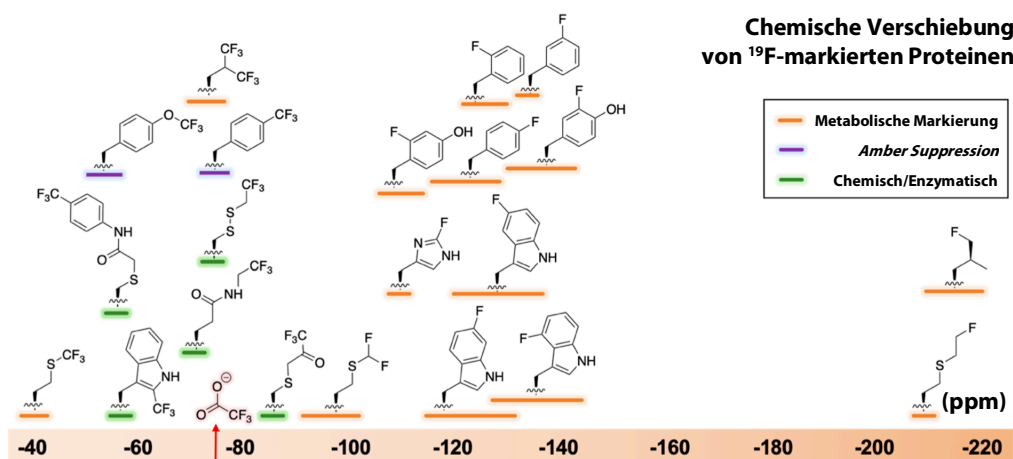


Abbildung 2.4 Chemische Verschiebungsbereiche von Fluor-Markierungen, die in Proteine eingebaut sind, bezogen auf Trifluoracetat.^[155]

Eine besondere Herausforderung für die ProF-NMR stellt die Anisotropie der chemischen Verschiebung (*chemical shift anisotropy*, CSA) des ^{19}F -Kerns dar. Die CSA kann die dominante Quelle der Resonanzverbreiterung für Proteine mit mittlerem bis hohem Molekulargewicht sein. Mit dem Quadrat der Feldstärke skaliert die CSA, wodurch Empfindlichkeitsgewinne bei hohen Magnetfeldern begrenzt werden. Nichtsdestotrotz befinden sich die zu adressierenden Seitenketten oft hauptsächlich auf der Proteinoberfläche, was zu einer Seitenkettenflexibilität führt, die zur Reduzierung von Anisotropieeffekten führt und so die Resonanzverbreiterung im NMR-Spektrum zu verringert.^[66]

Eine bevorzugte Methodik zur ^{19}F -Inkorporation ist die Sequenz-selektive metabolische Markierung zur ProF-NMR. Sie profitiert von einer natürlichen Markierungsstrategie ohne

chemisch-unnatürliche Einschränkungen des Proteins und führt zu einer globaleren Markierung des Proteins für den Nachweis orthosterischer Bindungsstellen. Im Gegensatz dazu markiert die ortsselektive Cystein-Biokonjugation oder die *Amber Suppression* nur eine oder wenige Stellen und führt zur Einführung nicht proteinogener Strukturmoleküle in das Proteinsystem, die möglicherweise die Funktion oder Faltung beeinflussen können. In den vergangenen Jahren wurde die metabolische Markierung mit fluorierten Aminosäuren detailliert untersucht.^[62,67] Ein üblicher Ansatz für die Expression fluorierter Proteine ist die Verwendung auxotropher Zelllinien zur Unterdrückung der Produktion der zu markierenden Aminosäure. Nach Zugabe der fluorierten Aminosäure in das Medium und Induktion der Proteinexpression wird die ^{19}F -markierte Aminosäure nach Aktivierung der Promotorregion durch die zelluläre Maschinerie in das Zielprotein eingebaut. Weiterhin wurde zur Markierung aromatischer Aminosäuren unter Verwendung von Glyphosat berichtet, das den Shikimat-Weg hemmt, der für die Biosynthese von Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan verantwortlich ist.^[68] Alternativ bietet sich der Einsatz von Fluoroindolen. Hierbei entsteht Fluor-Tryptophan aus Serin und Fluoroindol über die Tryptophan-Synthase. Die Methode ist kompatibel mit Standard-Laborstämmen (z.B. BL21(DE3)).^[69] Eine Besonderheit besitzt Fluor-markiertes Tryptophan für NMR-Untersuchungen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Die Tryptophanreste sind vorwiegend an hydrophoben Grenzflächen von Protein-Protein-Komplexen^[66,70] angereicht und weisen im Vergleich zu anderen Aminosäuren eine niedrige Häufigkeit auf. Das geringe Vorkommen minimiert die Möglichkeit struktureller Störungen und unerwünschter Signalüberlagerungen einzelner Fluor-markierter Tryptophan-Signale. Darüber hinaus wird die Komplexität des NMR-Spektrums und die daraus resultierende Herausforderung bei der Zuordnung der eingebauten Fluoratome reduziert.

2.3.3 Zielsetzung

Um die ligandeninduzierte Konformationsänderung des "verdrehten" Homodimers in Lösung zu analysieren, wurde eine Fluorsonde in Form von 5-Fluor-L-tryptophan in die TGT eingeführt. Die Sonde wird zur Überprüfung des Proteinzustandes in Lösung verwendet. Die Röntgenkristallographie wurde eingesetzt, um den Einfluss der Fluormarkierung auf das Protein mit Hinblick auf die Ligandbindung zu bewerten. Veränderungen in der chemischen Umgebung nahe der ^{19}F -Kerne werden durch chemische Verschiebung der Fluorkerne durch NMR-Messungen empfindlich gemeldet. Durch die Bindung eines Liganden kann ein direkter Einfluss eines spezifischen Fluorkerns von insgesamt vier unterschiedlich platzierten Tryptophanen (Trp95, Trp178, Trp296 und Trp326) beeinflusst werden oder die Dimerdynamik so verändert werden, dass Signale, die die Nähe der Dimer-Grenzfläche betreffen, beeinflusst werden. Bei Änderung der gesamten Dimeranordnung erhalten alle vier Signale unterschiedliche chemische Einflüsse und spiegelt sich im ^{19}F -NMR-Spektrum wider.

2.4 Ergebnisse

2.4.1 Expression und Reinigung von 5F-Trp-TGT

Die TGT enthält insgesamt vier Tryptophan-Reste, von denen sich Trp95 und Trp326 nahe der Dimer-Grenzfläche befinden. Die verbleibenden zwei, Trp178 und Trp296, befinden sich weiter von der Grenzfläche entfernt, wobei Trp178 vollständig in das Protein eingebettet ist, wohingegen Trp296 teilweise lösungsmittel exponiert vorliegt (Abbildung 2.5).

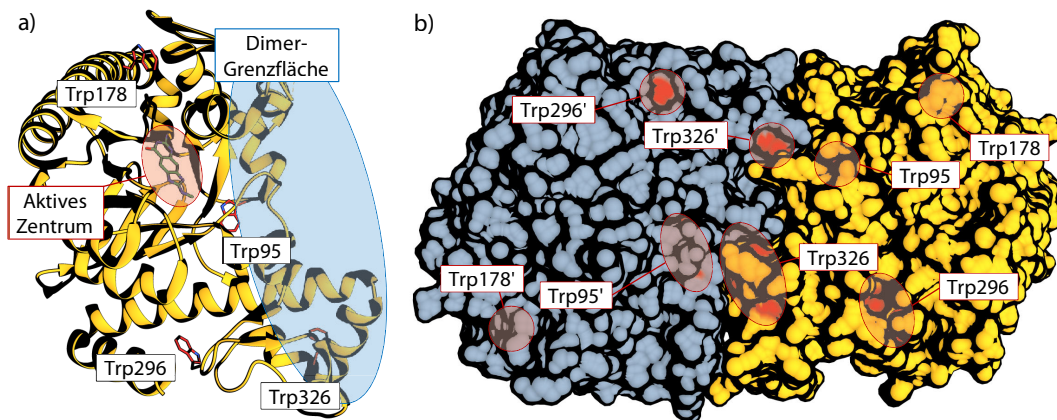


Abbildung 2.5 a) Kristallstruktur der TGT mit einem exemplarischen Liganden (Orange, Ligandgrün, PDB Code: 4PUK)^[71] in der aktiven Tasche in der aktiven Dimerform. Die vier Trp-Reste: Trp95, Trp178, Trp296 und Trp326 sind in rot als Stäbchenmodell dargestellt. **b)** Oberflächendarstellung der TGT in der aktiven Dimerform. Die Orientierung des gelben Monomers aus a) ist um 180° in der Horizontalen gedreht und zeigt die Rückseite des Dimers mit dem Dimerpartner in blaugrau. Oberflächenexponierte Trp sind in rot abgebildet. Sowohl Trp95 und Trp326 befinden sich nahe der Dimer-Grenzfläche, während Trp296 teilweise lösungsmittel exponiert an der Rückseite des Proteins vorliegt. Trp178 befindet sich eingebettet im Proteinzentrum nahe an der aktiven Tasche.

Der biosynthetische Einbau von 5-Fluor-L-tryptophan (5F-Trp) in die TGT (TGT_{5FW}) wurde durch die Verwendung eines Trp-auxotrophen Bakterienstammes, wie in der Literatur beschrieben, mit einigen Modifikationen durchgeführt.^[72] In der Masterarbeit des Autors wurde ein nicht-auxotropher BL21 (DE3)-Bakterienstamm verwendet, dem vor der IPTG-Induktion Glyphosat zugesetzt wurde, um die Biosynthese aromatischer Aminosäuren zu blockieren.^[73] Mit beiden Methoden ist es möglich, fluoriertes Protein zu erhalten. Dennoch verursacht die Toxizität von Glyphosat eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum, wodurch das gesamte Expressionsniveau und dadurch die Ausbeute am gereinigtem Protein gesenkt wird.^[74] Daher wurde die Verwendung eines Trp-auxotrophen Bakterienstammes bevorzugt und einem Optimierungsprozess unterzogen. Die Ausbeute des gereinigten Proteins konnte nahezu bis zum Wildtyp-Expressionsniveau optimiert werden. Vor allem konnte die Einbaurrate von 5F-Trp durch einen Schlüsselprozess nahezu quantitativ vollständig erhalten werden. Nach Erreichen der optischen Dichte von 0.5 der Zellkultur wurden die Zellen in ein Tryptophan-freies Medium gegeben. Die Zugabe von 5F-Trp wurde erst nach zwei Stunden

Inkubationszeit bei 25 °C hinzugefügt. Die längere Inkubationszeit sowie die erhöhte Temperatur bieten genügend Raum, damit sich die Zellen während dieser Zeit weiter teilen können. Dadurch wird der Tryptophan-Speicher reduziert und erhöht die Modifikationsrate nach Zugabe von 5F-Trp. Die Reinigung des Proteins konnte unabhängig von der eingebrachten Fluorsonde unverändert nach der Literatur gereinigt werden.^[39]

Die Identität des gereinigten Proteins wurde über denaturierende ESI-Massenspektrometrie erhalten (Abbildung 2.6). Das charakteristische Molekulargewicht von Fluor (~19 u) zeigt sich im Einbau pro Tryptophan in einer Steigerung des Molekulargewichts um 18 Da. So ist es möglich, aufgrund von vier Fluorierungspositionen insgesamt fünf verschiedene TGT-Varianten im Massenspektrum zu finden. Aus dem Massenspektrum wird ersichtlich, dass der Hauptbestandteil des gereinigten Proteins die vollständig fluoriierte Variante ist. Lediglich ein geringer Anteil konnte als Wildtyp-Protein, sowie als das dreifach eingebaute 5-F-Trp-TGT identifiziert werden.

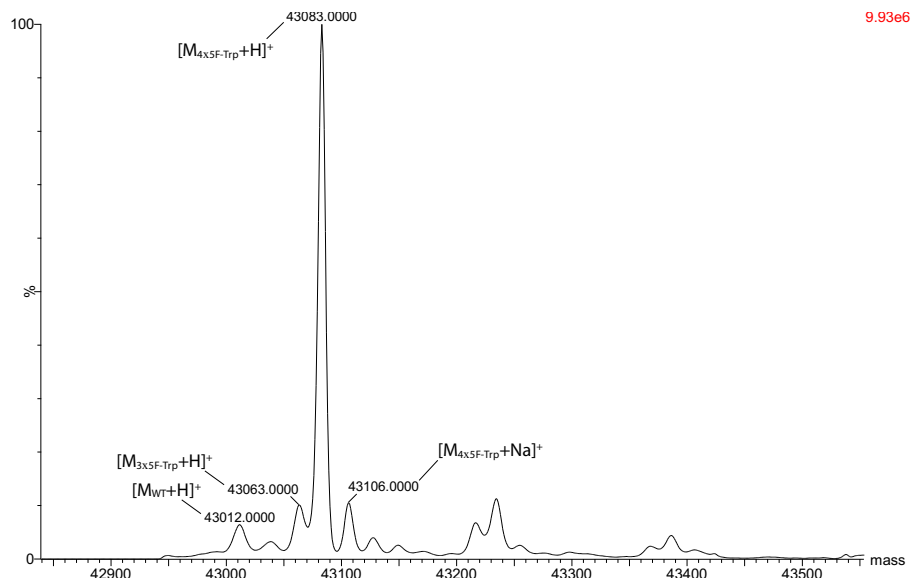


Abbildung 2.6 ESI-Massenspektrum nach Reinigung von Fluor-markiertem Wildtyp-TGT (TGT_{5FW}) durch metabolische Markierung mit 5-Fluor-L-tryptophan.

2.4.2 Charakterisierung von TGT_{5FW}

Um sicherzustellen, dass der Einbau von 5F-Trp die Funktionalität sowie die räumliche Stabilität des Proteins nicht beeinträchtigt, wurde die fluoriierte Variante in Bezug auf das Wildtyp-Protein untersucht.

Der Einfluss der vier eingebrachten 5F-Trp-Reste in die TGT wurde in Bezug auf die Thermostabilität der Faltung des Proteins untersucht. Wie in der Literatur beschrieben, können in

einigen Fällen bereits wenige Fluoratome die Proteinstruktur stabilisieren^[75], bzw. destabilisieren^[76]. Die Stabilisierung drückt sich unter anderem durch eine erhöhte Thermostabilität des Proteins aus, bei der die biologische Aktivität bei vergleichsweise höheren Temperaturen erhalten bleibt. Ebenfalls setzt die Denaturierung am Protein erst bei höheren Temperaturen ein. Die Schmelzpunktbestimmung ergab für die Wildtyp-Variante 69.2 °C, während die fluoriierte Variante einen leicht niedrigeren Wert von 67.3 °C aufwies (Abbildung 2.7a und Abschnitt 5.8.3). Dies deutet auf einen leicht destabilisierenden Effekt ($\Delta T_m [\text{WT} \rightarrow \text{5FW}] = -1.9 \text{ °C}$) durch die eingebrachten vier Fluorkerne in der Struktur hin. Dennoch liegen beide Thermostabilitäten im ähnlichen Bereich und spricht daher für eine vergleichbare Stabilität beider Proteinvarianten.

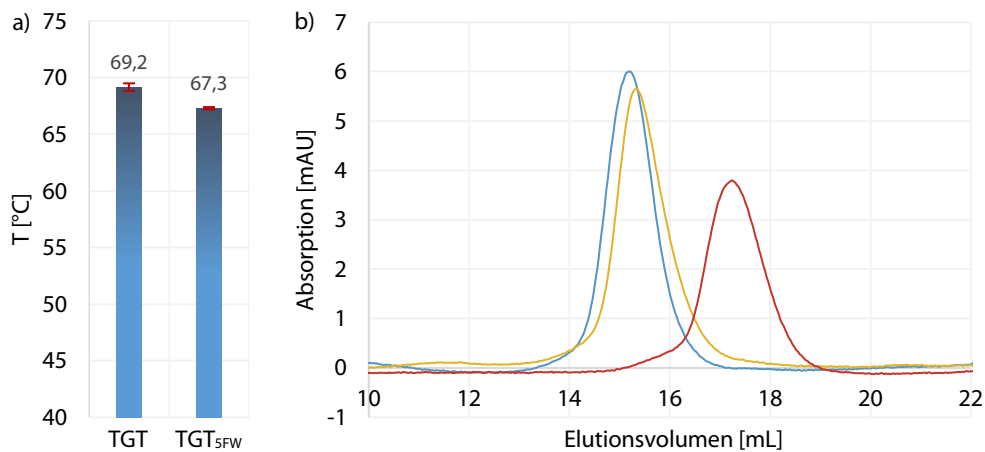


Abbildung 2.7 a) Bestimmung der Schmelzpunkte T_m von TGT und TGT_{5FW} über einen *Thermal-Shift*-Assay. Die Fehlerbalken zeigen die berechneten Standardabweichungen aus drei Messungen. **b)** Größenausschluss-Chromatographie mit Hilfe einer *Superdex™ 200 10/300 GL* (GE HEALTHCARE) mit je 10 μM Wildtyp-Protein (blau, $\approx 98\%$ Dimer), TGT_{5FW} (gelb) und TGT Y330D (rot, $\approx 1\%$ Dimer). Das Monomer/Dimer-Verhältnis wurde durch native Massenspektrometrie ermittelt.^[38]

Weiterhin wurde der destabilisierende Effekt in Bezug zur Dimerstabilität geprüft. Die Publikation von JAKOBI *ET AL.* befasst sich mit der Destabilisierung des Dimers im Zusammenhang mit eingeführten Mutationen im Bereich wichtiger Wechselwirkungen im *Hot Spot*.^[39] Insbesondere Veränderungen an der Dimer-Grenzfläche beeinflussen das Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer und führen zu einer Verschiebung zum Monomer hin. Bei einer Proteinkonzentration von 10 μM beträgt das Dimer-Verhältnis im Wildtyp-Protein 98% wie sich durch Bestimmung mittels native Massenspektrometrie finden lässt. Im Gegensatz dazu bewirkt die Y330D-Mutation in der TGT eine Absenkung des Dimeranteils auf nur noch 1%. Zur Untersuchung der Dimerstabilität wurde eine analytische Größenausschluss-Chromatographie angewandt. Das Prinzip der Untersuchungsmethode beruht auf der Trennung des hydrodynamischen Volumens zwischen Monomer und Dimer. Im Prozess der Filtration liegen die Proteinvarianten im Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer vor. Kommt es zu einer

destabilisierenden Wirkung auf das Dimer, wird das Gleichgewicht hin zum monomeren Zustand verschoben, wodurch die Elution aufgrund des geringeren durchschnittlichen hydrodynamischen Volumens später erfolgt als bei der Dimer-Variante. Die Ergebnisse der Größenausschluss-Chromatographie im Vergleich der drei Proben TGT_{WT}, TGT_{5FW} und TGT Y330D sind in Abbildung 2.7b dargestellt. Die Größenausschluss-Chromatographie-Analyse zeigt, dass sich die fluoriierte Proteinvariante TGT_{5FW} im Elutionsvolumen sehr ähnlich zum Wildtyp-Protein verhält. Schließt man in die Untersuchung die TGT-Variante Y330D mit ein, so zeigt diese ein Elutionsvolumen, dass sich um etwa 4 mL zum Wildtyp unterscheidet und daher deutlich im hydrodynamischen Volumen abhebt. Daher entspricht das hydrodynamische Volumen der TGT_{5FW}-Variante eher dem Verhalten des unveränderten Wildtyp-Proteins und zeichnet sich durch die übliche Dimerstabilität aus.

Abschließend zur Charakterisierung der Proteinvariante, wurde die TGT_{5FW} unter den gleichen Bedingungen wie das Wildtyp-Protein kristallisiert, wobei plättchenförmige Kristalle erhalten wurden. Wie bei der nicht-fluorierten TGT weist der vermessene Kristall die *C*2-Raumgruppe auf und der gesammelte Datensatz ist bis zu 1.33 Å aufgelöst. Der Kristall enthält ein Monomer in der asymmetrischen Einheit und das Homodimer wird durch eine kristallographische zwei-zählige Drehachse gebildet. Die Elektronendichte zeigt an allen vier Trp-Resten (95, 178, 296 und 326) das Vorhandensein eines Fluorkerns an der erwarteten Position von 5F-Trp. Die eingefügte Fluorierung beeinträchtigt die strukturelle Faltung des Proteins in keiner Weise. Einzig bildet das Fluoratom von 5F-Trp95 zu den Amidbindungen Pro56 (3.1 Å) und Arg60 (2.9 Å) polare Wechselwirkungen, während die übrigen drei Fluor-atome ohne engeren Kontakt zu anderen Atomen am Tryptophan verbleiben (Abbildung 2.8).

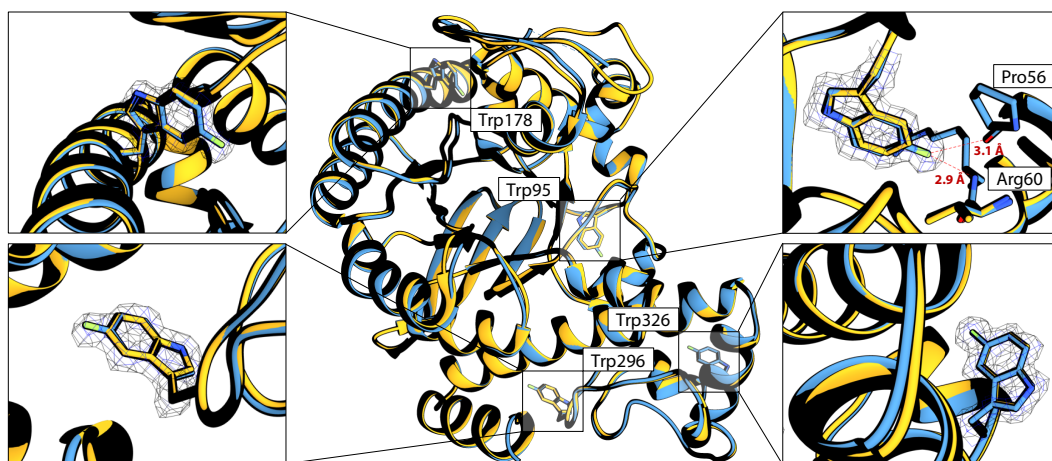


Abbildung 2.8 Darstellung der überlagerten *Z. mobilis* Strukturen TGT-Wildtyp (C_{gelb}, PDB Code: 1PUD)^[32] und TGT_{5FW} (C_{blau}, PDB Code: 6YGP) als Bändermodell. Die vier Trp-Reste: Trp95, Trp178, Trp296 und Trp326 sind farblich entsprechend der Modelle als Stäbchenmodell dargestellt. Die 2mF_o-DF_c-Dichten sind bei den 5F-Trp-Resten dargestellt (blau, Konturstufe 1.0 σ). Atom-Farbcode: O = rot, N = blau, F = grün.

Es kann daher angenommen werden, dass sich die Struktur des fluorierten Dimers nicht sehr von der des Wildtyp-Dimers unterscheidet, wie die Prüfmethode nahelegen. Darüber hinaus unterscheiden sich die ermittelten enzymkinetischen Parameter k_{cat} und k_{m} (tRNA^{Tyr}) (in **Kapitel 5** näher beschrieben) der Basenaustauschreaktion der fluormarkierten und nicht-markierten Variante nicht signifikant voneinander (siehe Abschnitt 5.8.1). Im Hinblick auf die anstehenden Ligandentitrationen wird aufgrund der Ergebnisse der Proteincharakterisierung ein ähnliches Bindungsverhalten wie beim Wildtyp-Protein erwartet.

2.4.3 ¹⁹F-NMR-Spektren von TGT_{5FW} und deren Mutanten

Das ¹⁹F-NMR-Spektrum von TGT_{5FW} zeigt vier separate Resonanzen (Abbildung 2.9a). Um diese den einzelnen 5F-Trp-Resten zuzuordnen, wurden drei Trp->Phe-Mutanten (W95F, W178F, W326F) konstruiert und vermessen. Insgesamt sollten durch die eingeführten Punktmutationen keine erheblichen Änderungen der Struktur verursacht werden. Die aufgefundenen Resonanzen entsprechen, mit einer leichten Varianz in der chemischen Verschiebung, den Resonanzen des unmodifizierten Wildtyp-Proteins. Fehlende Resonanzen in den ¹⁹F-Spektren der W95F-, W178F- und W326F-Mutanten konnten durch Vergleich mit dem Wildtyp-Spektrum eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 2.9b-d). Die Resonanz von 5F-Trp296 konnte als Ausschlusskriterium mit den vorliegenden Mutanten zugeordnet werden. Es fällt

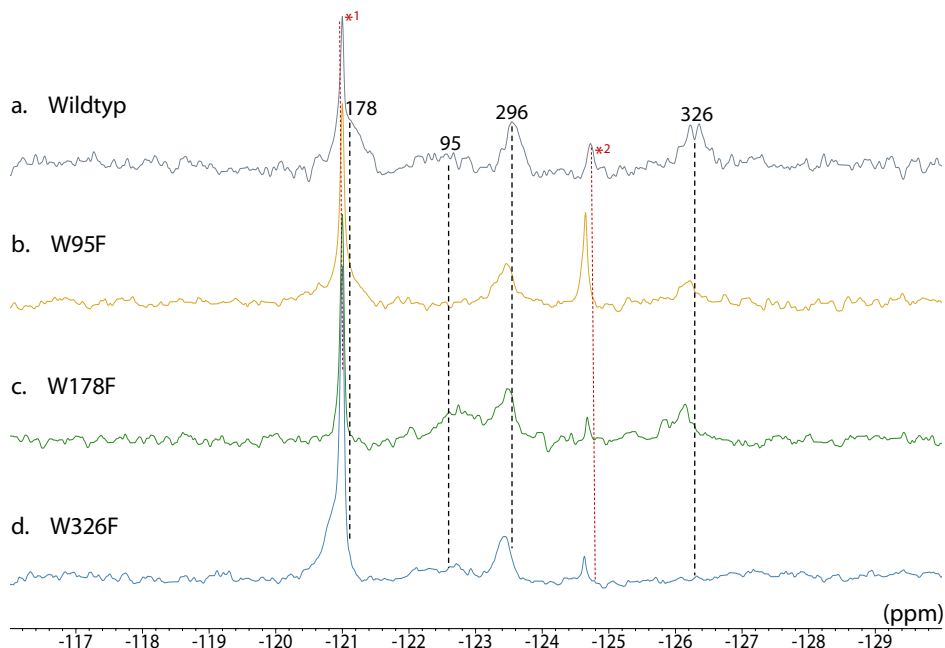


Abbildung 2.9 ¹⁹F-NMR-Spektren von TGT_{5FW} und Trp->Phe-Mutanten in Hochsalz-Puffer. Spektren wurden bei 37 °C und bei 600 MHz ¹⁹F-Frequenz aufgenommen. **a.** Wildtyp; **b.** W95F; **c.** W178F; **d.** W326F. Verunreinigungen sind mit einem Stern gekennzeichnet (*¹⁻²). *¹ konnte als Fluorid-Ion (F⁻) identifiziert werden.

auf, dass die Signale für Trp326 sowie insbesondere Trp95 verbreiteter und daher im Spektrum weniger augenfällig als die beiden anderen Resonanzen auftreten. Eine mögliche Erklärung ist das Vorhandensein dieser beiden Reste an der Protein-Grenzfläche des Dimers, so dass sich dort eine höhere Molekuldynamik der Reste abzeichnet. Abgesehen von den vier Hauptsignalen wurde im ^{19}F -NMR-Spektrum zwei schmale Signale bei ungefähr -121.0 und -124.6 ppm beobachtet. Durch Zugabe NaF konnte eine Zunahme der Intensität des Signals bei -121 ppm (*¹) beobachtet werden, welches mit dem Signal von 5F-Trp178 überlagert. Die Resonanz *² stammt vermutlich ebenfalls aus der Reinigung des Proteins und konnte in allen folgenden Spektren beobachtet werden. Durch die Schärfe dieses Signals liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier ebenfalls um die Resonanz einer niedermolekularen Spezies handelt.

Zusätzlich zu den ^{19}F -NMR-Spektren wurden die drei Trp->Phe-Mutanten (W95F, W178F, W326F) kristallographisch analysiert (Abbildung 2.10). Sie bestätigen die beobachteten Ergebnisse der ^{19}F -NMR-Spektren und weisen keine größeren Änderungen in der Faltung des Proteins auf. Zwei unterschiedliche Strukturmerkmale können dennoch entnommen werden. Die $\beta 3\alpha 3$ -Insertion in allen drei Strukturen variiert voneinander (siehe auch Abbildung 1.3b). Sie ist bekanntlich in die Bindung der tRNA involviert und hat infolgedessen eine höhere Flexibilität zur Stabilisierung des Makromoleküls. Interessanterweise führt die W95F-Mutation zu einer Auflösung des gesamten Schleifen-Helix-Motivs, das im geordneten Zustand den aromatischen *Hot Spot* vor dem Zugang von Lösungsmittelmolekülen schützt. Die Destabilisierung bewirkt insgesamt eine Änderung der Dimeranordnung durch Verkipfung eines Monomers gegenüber seinem Dimerpartner. Kristallographisch beinhaltet die veränderte Struktur eine Verkürzung der a-Achse der Einheitszelle um 6 Å. Die detaillierte Beschreibung der Mutante wird in Abschnitt 5.4.1 vorgenommen. Die Strukturinformation gepaart mit dem entsprechenden ^{19}F -NMR-Spektrum von W95F deutet darauf hin, dass die durch die Mutation

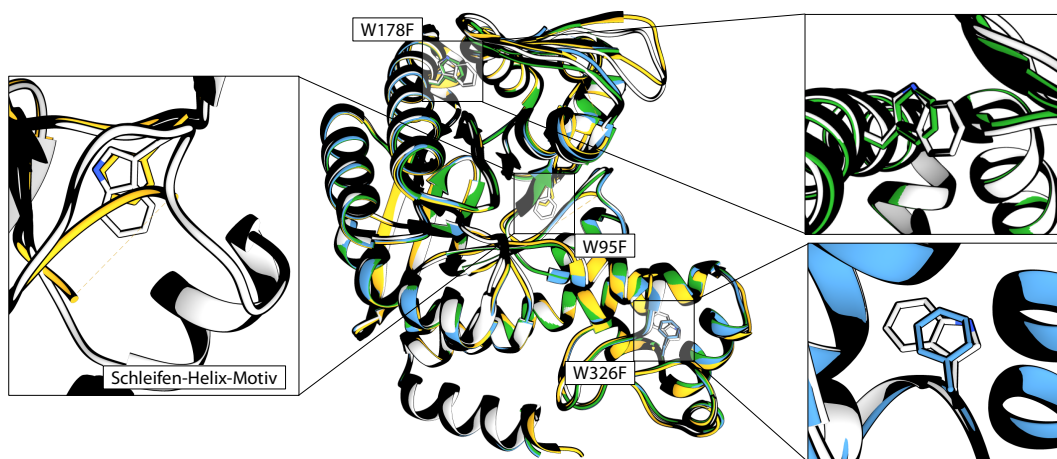


Abbildung 2.10 Überlagerte Kristallstrukturen der Wildtyp-TGT (C_{grau} , PDB Code: 1PUD)^[32] mit TGT_{5FW}-W95F (C_{gelb} , PDB Code: 6YGM), TGT_{5FW}-W178F ($C_{\text{grün}}$, PDB Code: 6YGW) und TGT_{5FW}-W326F (C_{blau} , PDB Code: 6YGL). Detaillierte Positionen der einzelnen Aminosäuren sind vergrößert dargestellt. Atom-Farbcode: N = blau.

bewirkte Destabilisierung des Schleifen-Helix-Motivs keine Veränderung der chemischen Umgebung der übrigen drei Fluorsonden in Lösung bedingt.

2.4.4 Proteinbeobachtete ^{19}F -NMR zur Charakterisierung nativer Protein-Ligand-Wechselwirkungen.

Um die Funktionalität der ^{19}F -Resonanzen von TGT_{5FW} für die Bindung kompetitiver Liganden in die aktive Tasche des Proteins zu überprüfen, wurde das *lin*-Benzohypoxanthine-Grundgerüst (**2.1**) dem fluorierten Protein in verschiedenen Konzentrationen hinzutitriert und die Bindung mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie beobachtet. Die Messung wurde bei 37 °C mit 0.5, 1.0 und 3.0 eq. des Liganden **2.1** durchgeführt. Ersichtlich wird, dass die Resonanz von 5F-Trp95 (ca. -122.5 ppm) bereits bei 0.5 eq. des Liganden eine chemische Verschiebung zu ungefähr -121.5 ppm erfährt und die zweite Spezies von 5F-Trp95 ungefähr 50% beträgt. Ab einer Titrationszugabe von 1 eq. des Liganden scheint die Bindung von **2.1** an das Protein gesättigt zu sein, da bei einer Steigerung des Überschusses auf 3 eq. keine Veränderung des Spektrums mehr auftritt. Interessanterweise befindet sich zwischen dem Liganden und dem Fluorkern von 5F-Trp95 eine Distanz von ungefähr 22 Å, so dass es keinen direkten geometrischen Einfluss geben sollte. Dagegen besteht ein näherer Kontakt zwischen dem Fluorkern von 5F-Trp178 und dem Liganden (ca. 9 Å), der jedoch keine chemische Verschiebung durch die Bindung des Liganden

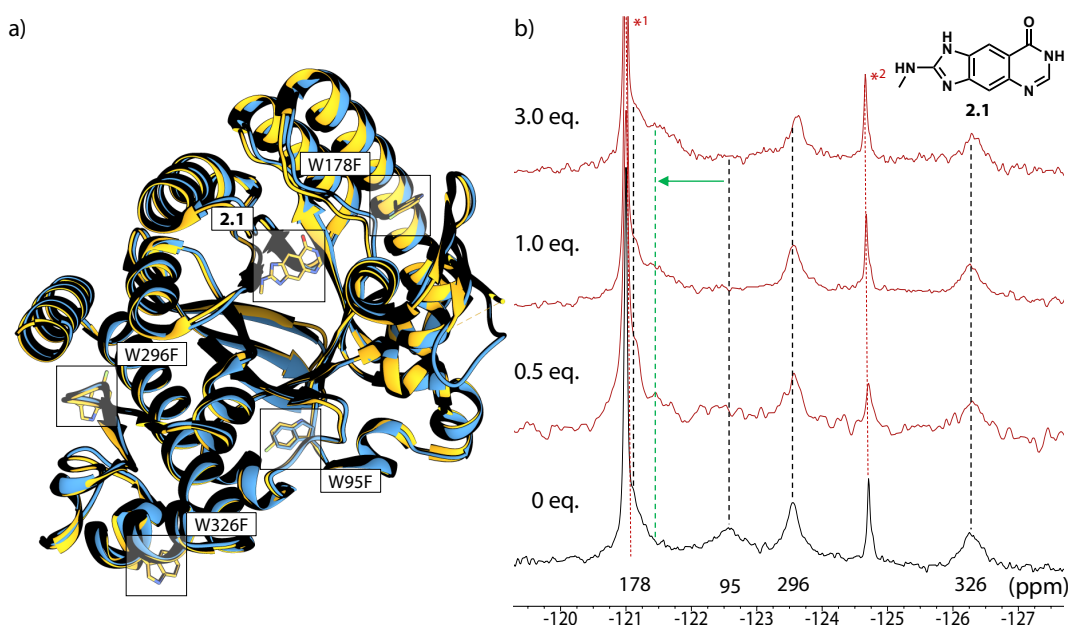


Abbildung 2.11 a) Überlagerte Kristallstrukturen der Wildtyp-TGT (C_{blau}, PDB Code: 1PUD)^[32] mit TGT_{5FW} in Komplex mit **2.1** (C_{gelb}, PDB Code: 6YH2). Atom-Farbcode: F = grün, N = blau, O = rot. b) ^{19}F -NMR-Spektren von TGT_{5FW} mit verschiedenen Äquivalenten von **2.1** in Hochsalz-Puffer. Spektren wurden bei 37 °C und bei 600 MHz ^{19}F -Frequenz aufgenommen. Verunreinigungen sind mit einem Stern gekennzeichnet (*¹⁻²). *¹ konnte als Fluorid-Ion (F⁻) identifiziert werden.

erfährt (Abbildung 2.11). Scheinbar reagiert der Fluorkern von 5F-Trp95 sehr sensitiv auf Bindung des Liganden **2.1** über einen derzeit unbekannten Mechanismus. Eine mögliche Beeinträchtigung der Dimer-Grenzfläche kann ausgeschlossen werden, da in diesem Fall auch eine Beeinflussung von 5F-Trp326 zu erwarten wäre, da dieser Rest unmittelbar an der Bildung der Dimer-Grenzfläche beteiligt ist. Spekulativ gesehen reagiert 5F-Trp95, das an der Dimer-Grenzfläche im Schleifen-Helix-Motiv vergraben liegt, womöglich empfindlich auf eine strukturelle Destabilisierung oder Veränderungen des zuvor erwähnten Motivs. Die vielleicht wichtigste Eigenschaft der ^{19}F -NMR ist die inhärente Empfindlichkeit des Fluors auf Änderungen in seiner lokalen Umgebung. Die chemische Verschiebung des Fluors wird in erster Linie durch einen großen paramagnetischen Term beeinflusst, was es besonders empfindlich für lokale Van-der-Waals-Wechselwirkungen und elektrostatische Felder macht.^[77] In **Kapitel 5** wurde in einem weiteren Projekt die Thermostabilität der strukturell destabilisierten W95F-Mutante überprüft. Überraschenderweise zeigte die Mutante eine signifikant niedrige Schmelztemperatur ($\Delta T_m [\text{WT} \rightarrow \text{W95F}] = -15.5^\circ\text{C}$) und unterstreicht die Bedeutung dieser Position von Trp95 hinsichtlich der Stabilität des Proteins.

Im Nachfolgenden wurden die Liganden **2.2** – **2.4** (Abb. 2.14 – 2.16) überprüft, die kristallographisch das "verdrehte" Dimer induzieren. Die destabilisierende Wirkung von *lin*-Benzoguanin-Liganden, die die Ribose-34-Tasche adressieren, ist gut untersucht und betrifft vorwiegend das Schleifen-Helix-Motiv.^[41,57] Abbildung 2.12 zeigt das Beispiel für eine Verbindung, die das Schleifen-Helix-Motiv durch Bindung in die aktive Tasche destabilisiert.^[57] Die terminal

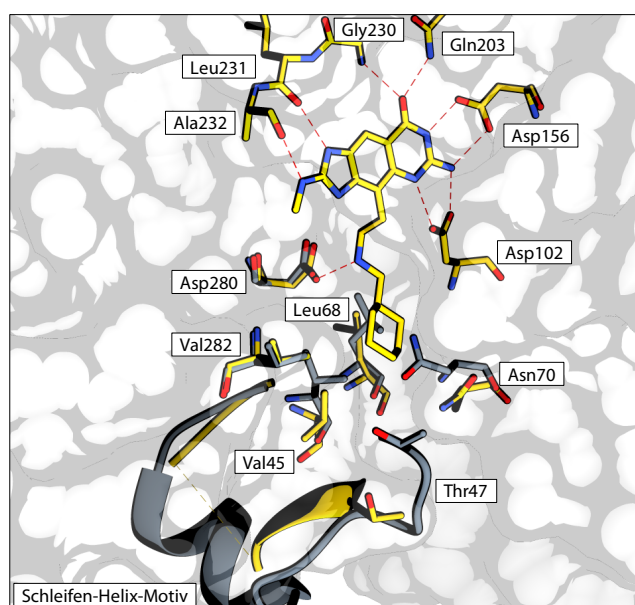


Abbildung 2.12 Schematische Überlagerung eines Liganden (C_{gelb}, PDB Code: 5I02)^[57] zur Destabilisierung des Schleifen-Helix-Motivs mit der intakten Wildtyp-TGT (C_{grau}, PDB Code: 1PUD)^[32]. In der ungestörten Form (C_{grau}) liegt das Motiv geordnet vor, in der gestörten Struktur (C_{gelb}) lässt sich dessen Verlauf in der Kristallstruktur nicht zuweisen.

angefügte Cyclohexyl-Gruppe adressiert die Ribose-34-/Phosphat-35-Tasche, wodurch ein ungünstiger Kontakt zu Val45 (2.7 Å) entsteht. Infolgedessen verschiebt sich der Rest um etwa 2 Å aus seiner ursprünglichen Position im ungestörten Protein. Weiterhin bestehen kurze Van-der-Waals-Kontakte zwischen der Cyclohexyl-Gruppe des Liganden zu den Resten Leu68 (~2.4 Å) und Asn70 (~1.0 Å). Insgesamt führt dies zu einer ausgeprägten Umorientierung der nachfolgenden Aminosäuresequenz Gly46 bis Ala49. Die Reste Thr50 bis Thr62 sind aufgrund der Umstrukturierung des Schleifen-Helix-Motivs kristallographisch nicht mehr aufgelöst (Abbildung 2.12). Die damit verbundene strukturelle Umorientierung des Schleifen-Helix-Motivs führt in der Regel zum Eindringen von Wassermolekülen in den freigesetzten Bereich.

Insbesondere die beiden Dimer-Grenzflächen-Fluorsonden (5F-Trp95 und 326) werden empfindlich auf eine Veränderung der Quartärstruktur im Falle des "verdrehten" Dimers reagieren. In Abbildung 2.13b ist die schematische Darstellung der 5F-Trp-Reste in der "verdrehten" Konfiguration des Dimers abgebildet. Durch die neu ausgebildete Dimer-Grenzfläche (s. auch Abbildung 2.3) verändern sich vor allem die chemischen Umgebungen der beiden 5F-Trp-Reste 95 und 326. 5F-Trp326 befindet sich in seiner neuen Ausrichtung wieder an der Dimer-Grenzfläche. Der aromatische *Hot Spot* (Phe92', Trp326, Tyr330 und His333) wird konsequent umstrukturiert, so dass Phe92' durch Tyr72' ersetzt wird. Diese lokale Veränderung sollte auch vom 5F-Trp326 empfindlich wahrgenommen werden. Im Gegensatz dazu orientiert sich 5F-Trp95 in der verdrehten Dimer-Anordnung aus der Dimer-Grenzfläche heraus und befindet sich jetzt inmitten des kristallographisch ungeordnet vorliegenden Schleifen-Helix-Motivs.

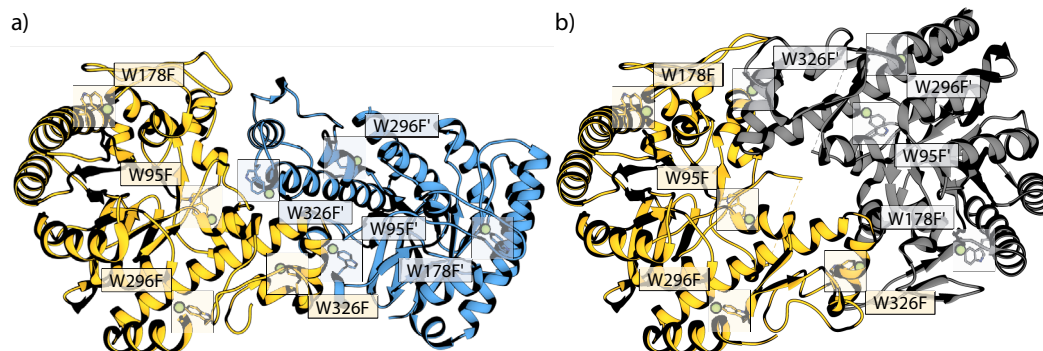


Abbildung 2.13 Schematische Darstellung der *Z. mobilis* Strukturen **a)** TGT-Wildtyp (PDB Code: 1PUD)^[32] und **b)** das verdrehte Dimer-TGT in Komplex mit **2.2** (PDB Code: 5I07)^[41] als Bändermodell. Die vier 5F-Trp-Reste: Trp95, Trp178, Trp296 und Trp326 sind als Stäbchenmodell dargestellt. Die Fluoratome wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit vergrößert. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau, F = grün.

Die Liganden **2.2** – **2.4** wurden mit 1 und 3 eq. zum Protein hinzutitriert und das Bindungsverhalten im ¹⁹F-NMR-Spektrum verfolgt. Kristallographisch wurde zudem die Bindung der Liganden zur fluorierten Proteinvariante überprüft. Die erhaltenen Kristallstrukturen entsprechen der Packung des Dimers in der Raumgruppe *C2*. Strukturell unterscheiden sich die

Kristallstrukturen des Wildtyps und der fluorierten Variante nur wenig voneinander bei der Bindung von **2.2** (Abbildung 2.14a). Wie bereits in Abbildung 2.12 dargestellt, stört die C(4')-Modifikation von **2.2** das Schleifen-Helix-Motiv durch kurze Van-der-Waals-Kontakte zu Leu68 und Asn70. Die daraus resultierenden Umlagerungen betreffen Val45, wodurch das Schleifen-Helix-Motiv aus der ursprünglichen Position verdrängt wird und kristallographisch im Streubild nicht mehr aufgelöst wird. Überraschenderweise unterscheiden sich beide Strukturen am Trp326-Rest. In der Kokristallisation von Wildtyp-Protein mit **2.2** kann eine Drehung des Rests um 180° beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wird in der fluorierten Variante diese Drehung nicht durch den Liganden induziert. Eine genauere Betrachtung des Dimers zeigt, dass die um 180° gedrehte Position aus Gründen der Sterik mit der fluorierten Variante der Tryptophane nicht möglich ist. Das Fluoratom am Tryptophan würde in zu engem Kontakt mit dem Amidsauerstoff von Met93' stehen, der normalerweise eine Wasserstoffbrücke zum Indolstickstoff von Trp326 ausbildet. Untersuchungen in **Kapitel 5** zeigen, dass die Funktion von Trp326 für die Dimerstabilität nicht essentiell ist.

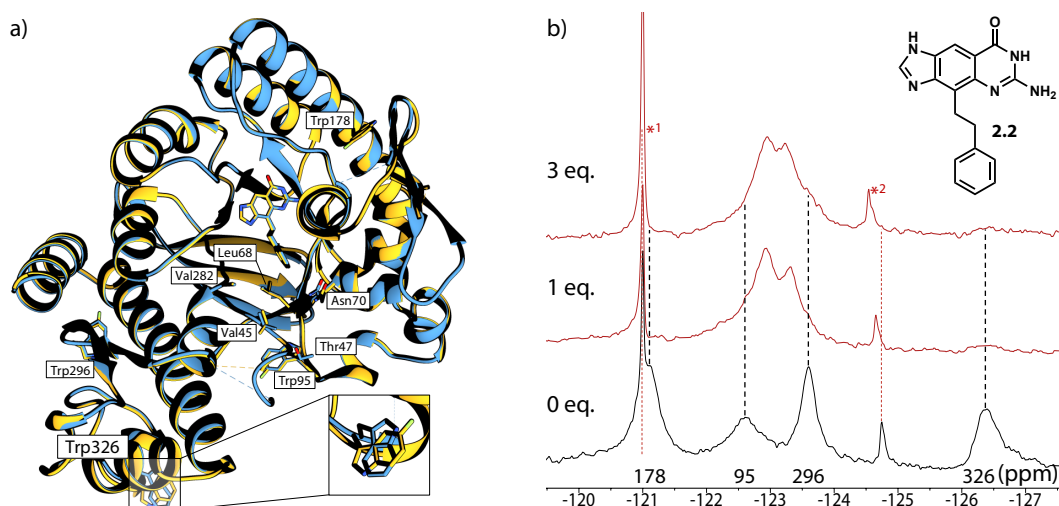


Abbildung 2.14 a) Darstellung der überlagerten *Z. mobilis* Strukturen der Wildtyp-TGT (C_{blau}, PDB Code: 6YGR) und fluormarkierter TGT (C_{gelb}, PDB Code: 6YGZ) in Komplex mit **2.2**. **b)** ¹⁹F-NMR-Spektren von TGT_{5FW} mit verschiedenen Äquivalenten von **2.2** in Hochsalz-Puffer. Spektren wurden bei 37 °C und bei 600 MHz ¹⁹F-Frequenz aufgenommen. Verunreinigungen sind mit einem Stern gekennzeichnet (*¹⁻²). *¹ konnte als Fluorid-Ion (F⁻) identifiziert werden. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau, F = grün.

Im Gegensatz zur Titration von **2.1** zeigt die Titration von **2.2** in die TGT_{5FW}-Proteinlösung massive Veränderungen der beobachteten Resonanzen im ¹⁹F-NMR-Spektrum (Abbildung 2.14b). Die größten chemischen Verschiebungen erhalten die 5F-Trp-Reste 178 und 326. Beide Resonanzen sind bereits nach Titration von 1 eq. Ligand komplett aufgelöst und man erhält ein Spektrum, das hauptsächlich aus zwei nahen beieinander gelegenen relativ breiten Signalen (ca. -123.0 und -123.2 ppm) besteht. Es scheint, dass am Ende der Titration alle vier Signale in Folge der Bindung des Liganden eine ähnliche chemische Verschiebung aufweisen. Bereits nach

Zugabe eines Äquivalents ist die Bindung des Liganden fast vollständig, da nur wenige Änderungen des dynamischen Gleichgewichts nach Zugabe von drei Äquivalenten sichtbar sind. Eine genaue Betrachtung zeigt dennoch, dass im Bereich der Resonanzen von 5F-Trp95 und 296 bei 1 eq. Ligand sich leichte Signal-"Schultern" andeuten. Erst bei einer Titration von 3 eq. verschwindet die "Schulter" von 5F-Trp95, wohingegen die Resonanz von 5F-Trp296 bestehen bleibt. Gleichzeitig steigt die Intensität von -123.3 ppm auf ein ähnliches Niveau wie das zweite Hauptsignal, das sich im gleichen Zug verschiebt (-123.2 ppm). Die Verstärkung des Signals bei -123.2 ppm könnte auf die Manifestation einer bestimmten ligandeninduzierten Konformation hinweisen. Im Falle des "verdrehten" Dimers wird der Abstand zwischen der 5F-Trp178 zur nächstgelegenen Aminosäure des Dimerpartners von etwa 24.5 \AA auf 18 \AA reduziert und erklärt womöglich so die Verschiebung um 2 ppm. Weiterhin verschiebt sich das Signal von 5F-Trp326 signifikant. Die Neuordnung im "verdrehten" Dimer schafft eine neue chemische Umgebung für 5F-Trp326 und erklärt möglicherweise die Verschiebung um ungefähr 3 ppm.

In der Kristallstruktur von TGT_{5FW} in Komplex mit **2.3** werden ähnliche Änderungen der Proteinstruktur beobachtet (Abbildung 2.15a). Induziert durch den Liganden wird das Schleifen-Helix-Motiv nicht in der Elektronendichte aufgelöst. Im Gegensatz zur Wildtyp-Kristallstruktur bindet Ligand **2.3** in die fluoridierte Proteinvariante eindeutig und ist vollständig in der Elektronendichte definiert. Im Wildtyp-Protein liegt der C(4')-Substituent von **2.3** mit erhöhter Restmobilität vor. Dies zeichnet sich durch fehlende Differenzelektronendichte der 2'-OMe-Gruppe, als auch durch das Vorliegen in zwei alternativen Konformationen (Popula-

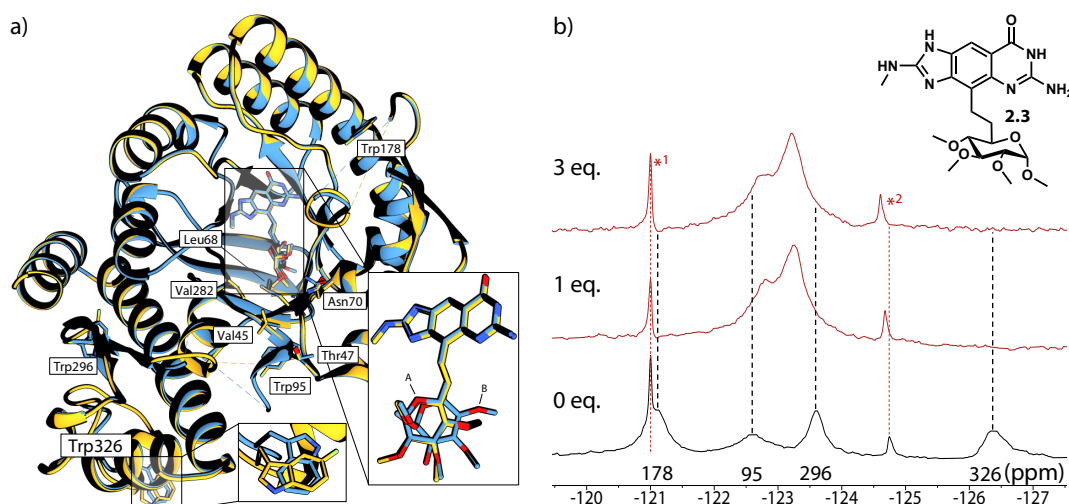


Abbildung 2.15 a) Darstellung der überlagerten *Z. mobilis* Strukturen der Wildtyp-TGT (C_{blau}, PDB Code: 5LPS)^[41] und fluormarkierter TGT (C_{gelb}, PDB Code: 6YGZ) in Komplex mit **2.3**. **b)** ¹⁹F-NMR-Spektren von TGT_{5FW} mit verschiedenen Äquivalenten von **2.3** in Hochsalz-Puffer. Spektren wurden bei 37 °C und bei 600 MHz ¹⁹F-Frequenz aufgenommen. Verunreinigungen sind mit einem Stern gekennzeichnet (*¹⁻²). *¹ konnte als Fluorid-Ion (F⁻) identifiziert werden. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau, F = grün.

tionen: A: 58%; B: 42%) ab. Wie auch bei **2.2** beobachtet, führen die vorgefundenen Bindungsmodi des Monosaccharids von **2.3** zu einer Umlagerung der hydrophoben Reste Val282, Leu68 und Val45, ausgelöst durch sterisch anspruchsvolle Wechselwirkungen mit Leu68. Im fluorierten Protein nimmt Ligand **2.3** ohne eine zweite alternative Anordnung die Position des höher besetzten Konformers im Wildtyp an. Diese Position wird analog im "verdrehten" Dimer als bevorzugte Konformation angenommen. Wie bereits beschrieben, liegt 5F-Trp326 aus sterischen Gründen in der gleichen Anordnung wie im Wildtyp vor.

Die Titration von **2.3** in die fluoridierte Proteinvariante zeigt ein ähnliches Verhalten wie unter **2.2** beschrieben. Bereits nach Zugabe von einem 1 eq. Ligand wird eine Sättigung des Proteins beobachtet. Durch die Verschiebung der Resonanzen von 5F-Trp178 und 326 zu ähnlichen Resonanzpositionen wie für 5F-Trp95/296, bildet sich ein überlagerter Signalbereich mit zwei Hauptintensitäten (−122.8 und −123.2 ppm) aus. Es kann dabei beobachtet werden, dass ein deutlicher Unterschied der Intensitäten vorliegt. Anscheinend verschiebt der Ligand das dynamische Gleichgewicht stärker in Richtung des Signals bei −123.2 ppm. Diese Beobachtung konnte in ähnlicher Weise bei Ligand **2.2** beobachtet werden.

Schließlich wurde der letzte Ligand **2.4** aus dieser Reihe zunächst kristallographisch und anschließend mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie untersucht. Wie erwartet liegt die Proteinstruktur bis auf 5F-Trp326 in einer sehr ähnlich Anordnung wie im Wildtyp vor. Mit seiner Acetonid-Gruppe aus der C(4')-Modifikation induziert der Ligand, wie üblich, die kristallographische Unordnung des Schleifen-Helix-Motivs durch kurze Van-der-Waals-Kontakte zu Val45, Leu68

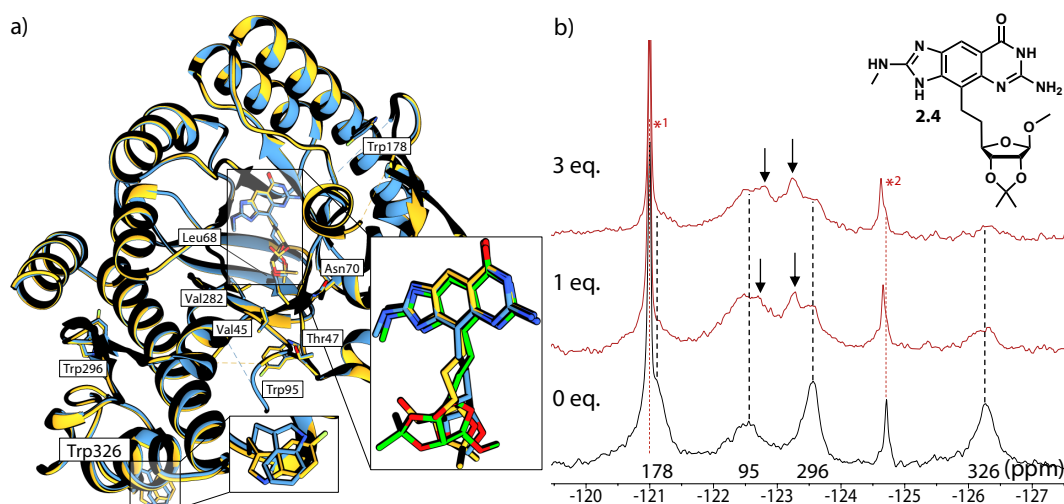


Abbildung 2.16 a) Darstellung der überlagerten *Z. mobilis* Strukturen der Wildtyp-TGT (C_{blau}, PDB Code: 5LPP)^[41] und fluormarkierter TGT (C_{gelb}, PDB Code: 6YHE) in Komplex mit **2.4**. Die Großansicht von Ligand **2.4** zeigt die Überlagerung einschließlich der Konformation im verdrehten Dimer (C_{grün}, 2.52 Å Auflösung, PDB Code: 5LPQ)^[41] **b)** ^{19}F -NMR-Spektren von TGT_{SFW} mit verschiedenen Äquivalenten von **2.4** in Hochsalz-Puffer. Spektren wurden bei 37 °C und bei 600 MHz ^{19}F -Frequenz aufgenommen. Verunreinigungen sind mit einem Stern gekennzeichnet (*1-2). *1 konnte als Fluorid-Ion (F⁻) identifiziert werden. Atom-Farbcod: O = rot, N = blau, F = grün.

und Asn70. Im Gegensatz zur Wildtyp-Struktur, liegt Ligand **2.4** mit niedrigerer Flexibilität vor. Die Methylgruppen der Acetonid-Gruppen sind in der Elektronendichte vollständig definiert, während die Methylgruppe am 1'-OMe wie in der Wildtyp-Struktur in der Dichte nicht aufgelöst werden kann. Die Bindungsmodi der Zuckereinheit in beiden Strukturen ordnen sich sehr ähnlich an und unterscheiden sich nur in der Konformation des überbrückenden Ethylenteils. Ein Vergleich zur "verdrehten" Dimer-Struktur zeigt, dass trotz geringer Auflösung der Kristallstruktur, der Ligand **2.4** vollständig und zudem einen anderen Bindungsmodus aufweist. Der Ligand induziert die Unordnung des Schleifen-Helix-Motivs anstelle der Acetonid-Gruppe mit der Methoxy-Gruppe. Es zeigt sich offensichtlich, dass die Bindungspose des Liganden **2.4** im funktionalen Dimer die Ribose-34-Tasche nicht optimal besetzt bzw. mit hoher Unordnung und eine optimale Passgeometrie wird erst bei "Verdrehung" des Dimers erreicht.

Die Ergebnisse der ^{19}F -NMR-Spektroskopie von **2.4** unterscheiden sich von den vorherigen Titrationen (Abbildung 2.16b). Bereits nach Titration von 1 eq. **2.4** zur fluorierten TGT-Variante ist eine nahezu vollständige Sättigung des Proteins mit dem Liganden zu beobachten. Überraschenderweise ist der Ligand nicht in der Lage, das analoge Muster wie im Fall der Bindung von **2.2** und **2.3** vollständig zu induzieren. Selbst wenn dem Protein ein Überschuss von 3 eq. des Liganden zugesetzt wird, können die Resonanzsignale aller vier 5F-Trp-Reste 95, 178, 296 und 326 weitgehend an den gleichen Stellen wie im unbesetzten Zustand beobachtet werden. Wie aus den beiden vorhergehenden Spektren bekannt, können dennoch die beiden mit der Ligandbindung neu auftretenden Signale bei -122.8 und -123.2 ppm (siehe Pfeile) zugeordnet werden, die auch durch die Bindung der beiden vorhergehenden Liganden **2.2** und **2.3** induziert wurden. Möglicherweise zeigt die Diskrepanz zwischen den Kristallstrukturen im funktionalen und "verdrehten" Zustand ein allgemein ungünstiges Bindungsverhalten von **2.4**



Abbildung 2.17 Darstellung der überlagerten *Z. mobilis* Strukturen der TGT_{5FW} (C_{gelb}, PDB Code: 6YGP) und "verdrehten" TGT-Dimer (C_{grau}, PDB Code: 5I07)^[41] in Komplex mit **2.2**. Der Bereich Gln107 - Lys116 ist in der "verdrehten" Dimerstruktur in rot hervorgehoben.

in die aktive Tasche, so dass unter dynamischen Gleichgewichtsbedingungen in Lösung das "verdrehte" Dimer nur teilweise ausgebildet wird. Dies wird durch die erhöhte Restmobilität der C(4')-Modifikation und einem Bindungsmodus angedeutet, der sich von dem im "verdrehen" Dimer unterscheidet. Ein abschließender Vergleich aller drei Protein-Ligand-Komplexe zeigt zudem eine ligandinduzierte Destabilisierung der Aminosäuresequenz Gln107 - Lys116 in der C2-Raumgruppe. Die Adressierung der Ribose-34-Tasche erzwingt die Verdrängung des Restes Gln107 mit steigender sterischer Anforderung der C(4')-Modifikation und destabilisiert folglich die α -Helix A. Außerdem stabilisiert sich diese Region innerhalb des "verdrehten" Dimers in einer anderen Anordnung als dies im unkomplexierten Protein der Fall ist. Hierdurch gelangt Val108 erstaunlicherweise in unmittelbarer Nähe zur Trp178, was Einfluss auf die Resonanz von 5F-Trp178 haben könnte (Abbildung 2.17).

Im weiteren Verlauf wurden zusätzliche vier Liganden (2.5 - 2.8) untersucht, die sich in der C(4')-Modifikation ähneln. Sie adressieren ebenfalls die Ribose-34-Tasche, es gelang aber bisher nur sie mit dem funktionalen Dimer kristallographisch zu untersuchen (Abbildung 2.18).

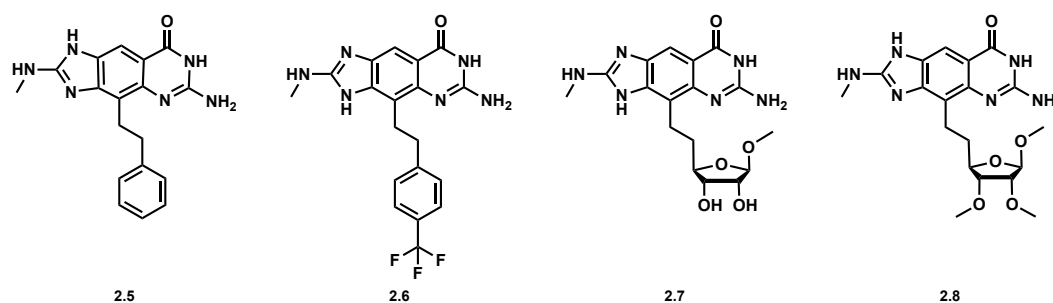


Abbildung 2.18 Strukturen der Liganden **2.5** - **2.8** zur Adressierung der Ribose-34-Tasche. Röntgenkristallographische Analyse der Liganden in Komplex mit TGT wurden bisher nur in der funktionalen Packungsform C2 gefunden. **2.5** wurde zudem in der Raumgruppe P2 kristallisiert. Dort enthält die Kristallpackung zwei unabhängige Monomere in der asymmetrischen Einheit und es liegen zwei Dimere unterschiedlicher Geometrie in der Struktur vor.

Zu großer Überraschenheit wurde der Ligand **2.5**, eine erweiterte Struktur von **2.2**, in der Raumgruppe P2 kokristallisiert. STENGL *ET AL.* untersuchten als erste die neuartige Packung der Moleküle aus Soakingsexperimenten.^[56] In der asymmetrischen Einheit in der Kristallpackung mit der Raumgruppe P2 sind nun zwei unabhängige TGT-Moleküle anstelle von einem in der C2-Raumgruppe vorhanden (Abbildung 2.20). Eines von ihnen (TGT₁) weist eine Proteinstruktur auf, die der Struktur von **2.1** in Komplex mit der TGT ähnelt. Das zweite (TGT₂) liegt durch den Liganden im Bezug auf das Schleifen-Helix-Motiv destabilisiert vor. Wie bereits in den Proteinstrukturen in Komplex mit **2.2** - **2.4** beschrieben, bildet der Ligand kurze Van-der-Waals-Kontakte zu Leu68, Asn70 aus, die folglich auch Val45 und Val282 betreffen. Im Gegensatz zur gut definierten Elektronendichte von Ligand **2.5** in der TGT₂, weist die Elektronendichte an der C(4')-Modifikation am Ligand in der TGT₁-Struktur unvollständig

definierte Bereiche auf (Abbildung 2.20a). Die Seitenkette an C(4') nimmt eine Konformation an, die sich der umgebenen Proteinstruktur anpasst und sich dadurch energetisch ungünstig platziert. Die Torsionswinkel über die Ethylenbrücke und zum Aromaten stellen eine planare Geometrie ein, dagegen ist eine Geometrie mit der Ethylenkette senkrecht zum Aromaten (90°) energetisch bevorzugt. Diese Geometrie wird in TGT₁ angenähert. Als Konsequenz nimmt Leu68 einen alternativen Torsionswinkel an, während Asn70 eine völlig andere Anordnung wie in der TGT₁ annimmt, um die ungünstigen sterischen Wechselwirkungen zu vermeiden. Dies drückt sich zudem auch durch einen hohen *B*-Faktor von bis zu 37.7 \AA^2 am Phenylring aus, der etwa doppelt so hoch ist wie der des *lin*-Benzoguanin-Grundgerüsts. Zur Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen wurden ehemals von STENGL *ET AL.* *Soaking*-Experimente verwendet. Die Methode erlaubt das zeitsparende Screening vieler Moleküle durch Tränken von "leeren" Einkristallen in der Ligandenlösung, hat aber den Nachteil, dass durch Liganden induzierte große Strukturänderungen oft nicht ermöglicht werden. Umso überraschender war

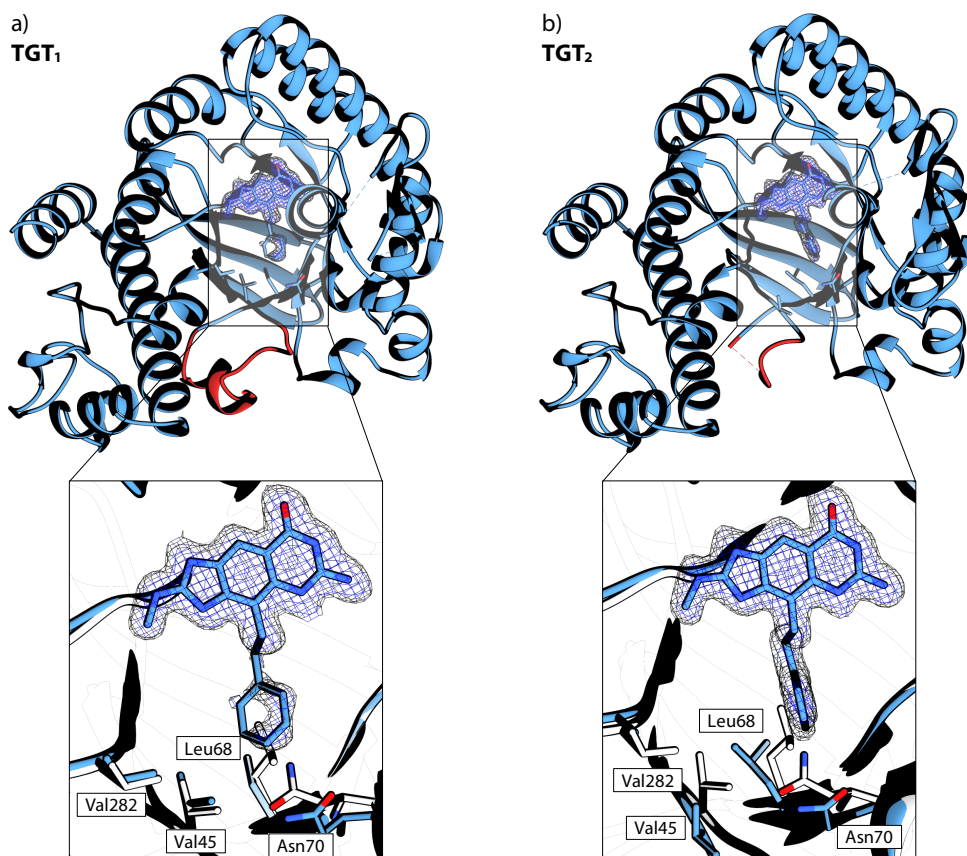


Abbildung 2.19 a) Kristallstruktur der *Z. mobilis* Wildtyp-TGT in Komplex mit **2.5** (C_{blau} , 1.58 \AA Auflösung, PDB Code: 6YIQ). Der Komplex wurde in der Raumgruppe *P2* kristallisiert und enthält in der asymmetrischen Einheit zwei unabhängige Monomere (TGT₁ und TGT₂). Das Schleifen-Helix-Motiv ist in beiden TGT-Strukturen in rot hervorgehoben. In der Vergrößerungsansicht sind die Proteinstrukturen mit der nichtkomplexierten Wildtyp-TGT-Struktur überlagert (C_{grau} , PDB Code: 1PUD)^[32]. Die $2mF_o-DF_c$ -Dichten sind am Ligand **2.5** dargestellt (blau, Konturstufe 1.0σ). Atom-Farbcode: O = rot, N = blau.

der Übergang zur *P2*-Raumgruppe durch das Tränken von Kristallen in der *C2*-Raumgruppe in der Ligandenlösung.

Der Vergleich von TGT₂ in Komplex mit **2.5** (*P2*-Raumgruppe) mit der fluorierten Komplexstruktur zeigt die gewohnten Störungen an den Resten Val45, Leu68, Asn70 und Val282, so dass das Schleifen-Helix-Motiv kristallographisch ungeordnet vorliegt. Ebenfalls durch den Ligand induziert, liegt die α -Helix A durch den kurzen Kontakt zu Gln107 destabilisiert vor. Im Gegensatz zu den vorherigen Strukturen ist die Positionierung von Trp326 identisch wie in der unkomplexierten Proteinstruktur (Abbildung 2.20a). Die Titration von **2.5** verhält sich in ähnlicher Weise zu **2.2**. Im ¹⁹F-NMR-Spektrum sind zwei Hauptsignale bei -123.2 und -122.9 ppm mit ähnlicher Intensität zu entnehmen, während sich die 5F-Trp-Resonanzen von Trp178 und Trp326 mit zunehmender Ligandenzugabe zum Bereich der Hauptsignale hin verschieben. Trotz fehlender Kristallstruktur in der "verdrehten" Dimer-Anordnung zeigt die Titration von **2.5** dasselbe Verhalten bezüglich der Proteinbindung und Signalverschiebung im Gleichgewicht in Richtung auf das "verdrehten" Dimer (Abbildung 2.20b).

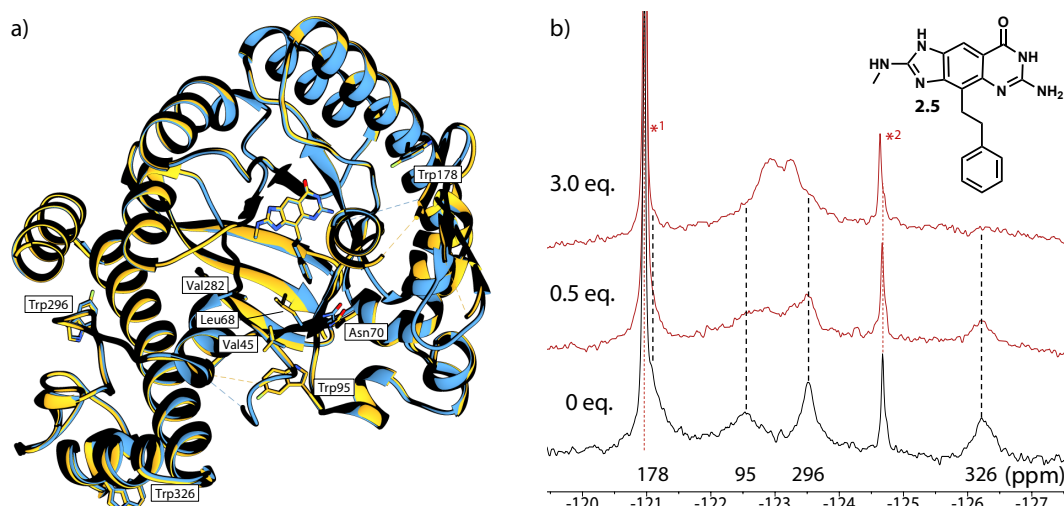


Abbildung 2.20 Darstellung der überlagerten *Z. mobilis* Strukturen der Wildtyp-TGT₂ (*P2*-Raumgruppe, C_{blau}, 1.58 Å Auflösung, PDB Code: 6YIQ) und fluor-markierter TGT (*C2*-Raumgruppe, C_{gelb}, 1.49 Å Auflösung, PDB Code: 6YH3) in Komplex mit **2.5**. b) ¹⁹F-NMR-Spektren von TGT_{5FW} mit verschiedenen Äquivalenten von **2.5** in Hochsalz-Puffer. Spektren wurden bei 37 °C und bei 600 MHz ¹⁹F-Frequenz aufgenommen. Verunreinigungen sind mit einem Stern gekennzeichnet (*1-2). *1 konnte als Fluorid-Ion (F⁻) identifiziert werden. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau, F = grün.

Die Kristallisation der neuartigen *lin*-Benzoguanin-Struktur **2.6** verhält sich im Wildtyp- und im Fluor-markierten Protein identisch. Ligand **2.6** stellt eine erweiterte Struktur dar, dessen unfluorierte Variante mit *p*-Methylgruppe bereits kristallographisch untersucht wurde.^[57] Ein Vergleich beider Bindungsmodi zeigt die identische Anordnung in der aktiven Tasche des Proteins. Die zusätzliche Elektronendichte an der *para*-positionierten CF₃-Gruppe zeigt eine dynamische Rotation um die eigene Achse, so dass die Fluoratome keine feste Anordnung am

Liganden aufweisen (Abbildung 2.21a). Aufgrund der zusätzlichen CF₃-Gruppe am Phenylring nimmt die C(4')-Modifikation eine um etwa 90° gedrehte Anordnung im Vergleich zum Bindungsmodus von **2.2/2.5** an, so dass der Ligand stärker auf das Lösungsmittel hin ausgerichtet vorliegt. Die Orientierung führt dennoch zu der mehrfach beobachteten kristallographischen Unordnung des Schleifen-Helix-Motivs bedingt durch die kurzen Van-der-Waals-Kontakte. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Liganden (**2.2** - **2.5**) entsteht kein kurzer Kontakt zu Gln107, wobei die Carbamoylgruppe dennoch eine leichte Rotation erfährt, um einen optimalen Abstand zum Liganden zu erhalten. Dies führt dazu, dass die α -Helix A nicht durch den Liganden destabilisiert wird.

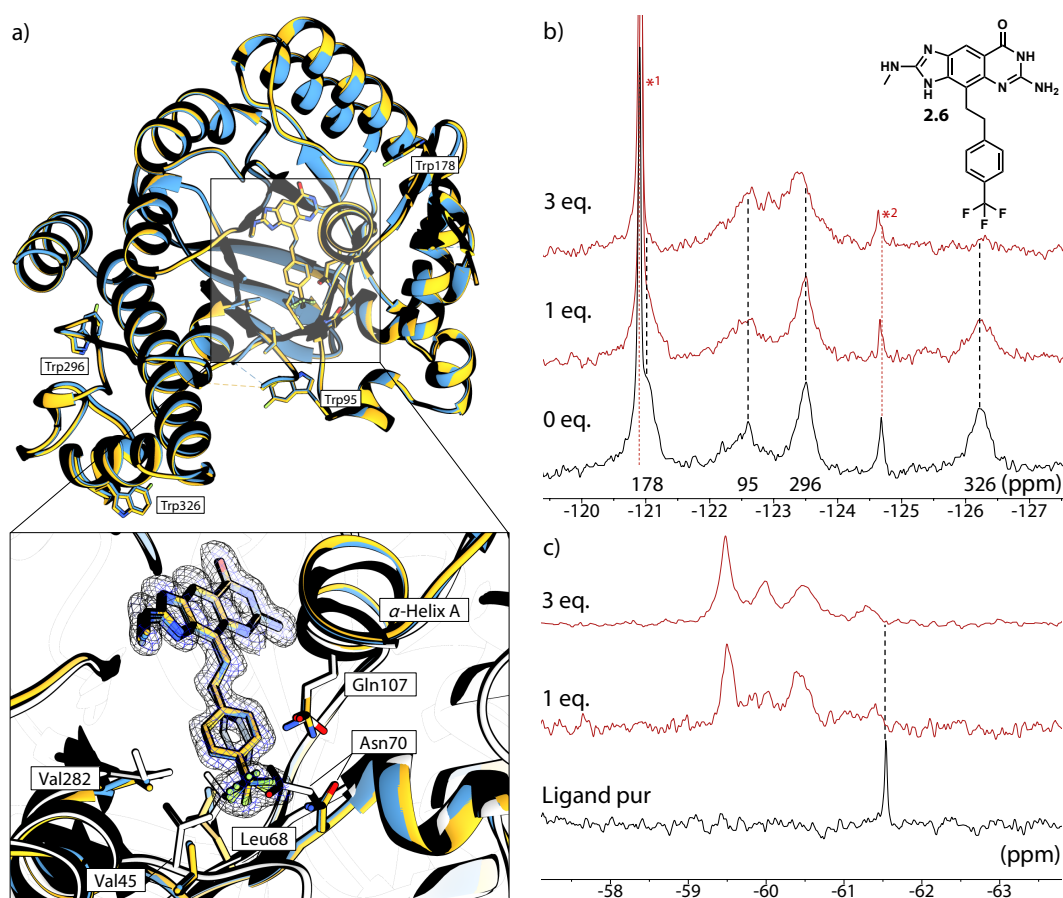


Abbildung 2.21 a) Darstellung der überlagerten *Z. mobilis* Strukturen der Wildtyp-TGT (C_{blau}, PDB Code: 6YGS) und fluormarkierter TGT (C_{gelb}, PDB Code: 6YH1) in Komplex mit **2.6**. Die Großansicht von Ligand **2.6** zeigt die Überlagerung einschließlich der unkomplexierten Wildtyp-Proteinstruktur (C_{grau}, PDB Code: 1PUD)^[32] und der Bindungsmodus von **2.2** (C_{dunkelgrau}, PDB Code: 6YH3) b) ¹⁹F-NMR-Spektren von TGT_{5FW} mit verschiedenen Äquivalenten von **2.6** in Hochsalz-Puffer. Spektren wurden bei 37 °C und bei 600 MHz ¹⁹F-Frequenz aufgenommen. Verunreinigungen sind mit einem Stern gekennzeichnet (*1-2). *1 konnte als Fluorid-Ion (F⁻) identifiziert werden. c) ¹⁹F-Resonanzen von **2.6** in Hochsalzpuffer und bei Titration mit dem fluorinierten Wildtyp-Protein. Atom-Farbcodierung: O = rot, N = blau, F = grün.

Die Titration des Liganden **2.6** zeigt hauptsächlich die Verschiebung der ^{19}F -Resonanzen von 5F-Trp178 und 5F-Trp326 in den erwarteten Bereich zwischen -122 und -124 ppm (Abbildung 2.21b). Ähnlich wie bei der Titration von Ligand **2.6** wird erst bei einem Überschuss von 3 eq. eine vollständige Verschiebung hin zum "gedrehten" Dimer im Spektrum beobachtet. Bei niedriger Konzentration ist hingegen noch deutlich das Spektrum des funktionalen Dimers zu erkennen. Im Gegensatz zu den ^{19}F -Resonanzen der Liganden **2.2** – **2.4** (ungefähr -123.2 und -122.8 ppm), die kristallographisch das "verdrehte" Dimer nachweislich induzieren, befinden sich die Signale mit den höchsten Intensitäten bei etwa -123.4 und -122.6 ppm. Zwischen diesen beiden Signalen werden stark verbreiterte Signal-Intensitäten beobachtet, die aus der Überlagerung mit den Signalen von 5F-Trp178 und 5F-Trp326 stammen. Insgesamt führt dies zu einem "zusammengesetzten" Bild des dynamischen Gleichgewichts, dass sich von den Spektren der Liganden **2.2** – **2.4** unterscheidet und eine etwas andere Population der beiden Dimere in Lösung vermuten lässt.

Die angefügte CF_3 -Gruppe an Ligand **2.6** lässt eine zusätzliche Untersuchung mit Hilfe der ^{19}F -NMR zu (Abbildung 2.21c). Eine einzelne Messung des reinen Ligand **2.6** im Messpuffer zeigt ein scharfes Singulett bei -61.5 ppm der niedermolekularen Verbindung und die drei Fluoratome mitteln sich durch schnelle Rotation zu einem Signal. Die Titration von 3 eq. Ligand **2.6** zu dem Zielprotein zeigen für die Fluoratome der CF_3 -Gruppe vier Signale, die auf unterschiedliche chemische Umgebungen bei -61.3 , -60.5 , -60.0 und -59.5 ppm hindeuten. Bei dem Zusatz von nur 1 eq Ligand heben sich nur zwei der vier Signale deutlich ab (-59.5 und -60.5 ppm). Das konzentrationsabhängige Spektralverhalten spiegelt auch hier die Komplexbildung der zwei unterschiedlichen Homodimere wider und entspricht dem Verhalten, das durch die Resonanzen der Fluortryptophane angedeutet wird. Die zwei Resonanzen bei 1 eq. entsprechen gegebenenfalls einer Anordnung der CF_3 -Gruppe mit einem Fluor senkrecht und zwei Fluoratomen nahe der Ebene des Aromaten. Bei drei Äquivalenten wird dann noch das zweite verdrehte "Dimer" populierte und könnte Anlass zu den beiden zusätzlichen Resonanzen geben.

Hinsichtlich des Liganden **2.4** wurde der Kontrollligand **2.7** verwendet, der im Gegensatz dazu keine Acetonid-Schutzgruppe in der Struktur aufweist. In einer früheren Untersuchung konnte dieser Ligand bereits kristallographisch untersucht werden.^[41,57] Die kristallographische Charakterisierung von **2.7** in der Fluorvariante der TGT unterscheidet sich nicht von der bisher untersuchten Struktur im Wildtyp-Protein (Abbildung 2.22). Sie zeigen beide das intakte Schleifen-Helix-Motiv, sowie die definierte Anordnung der α -Helix A in der Elektronendichte. Die Besonderheit des Liganden liegt in der Wechselwirkung zwischen dem endocyclischen Furanosid-Sauerstoff mit der Carbamoylgruppe von Gln107. Diese stabilisiert Gln107 in einer Position, die die Orientierung der α -Helix A (Gly105 bis Leu111) beeinflusst und somit die gleiche Konformation annimmt, die im "verdrehten" Dimer vorliegt. Asn70 nimmt während-

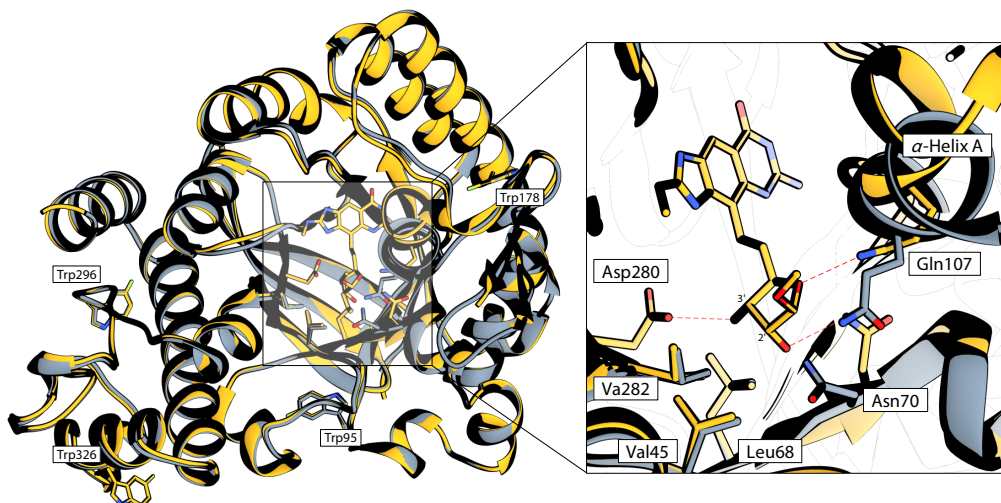


Abbildung 2.22 Darstellung der überlagerten *Z. mobilis* Strukturen der Wildtyp-TGT ohne Ligand (C_{grau}, PDB Code: 1PUD)^[32] und fluormarkierter TGT (C_{gelb}, PDB Code: 6YHE) in Komplex mit **2.7**. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau, F = grün.

dessen eine Position ein, die ehemals von Gln107 eingenommen wurde und bildet eine H-Brücke zu der 2'-OH-Gruppe am Ligand **2.7**. Weiterhin wird eine günstige H-Brücke durch Asp280 zur 3'-OH-Gruppe ausgebildet. Die hydrophoben Reste Val45, Leu68 und Val282 werden hingegen durch die Bindung von **2.7** nicht beeinflusst und liegen praktisch identisch wie im unkomplexierten Protein vor.

Die Ergebnisse der ¹⁹F-NMR-Untersuchung von **2.7** sind vergleichbar mit denen der Titration von Ligand **2.1** in die fluorierte Proteinvariante (Abbildung 2.23b). Beide Strukturen sind nicht in Lage das Schleifen-Helix-Motiv so zu verändern, dass kristallographisch eine Unordnung zu

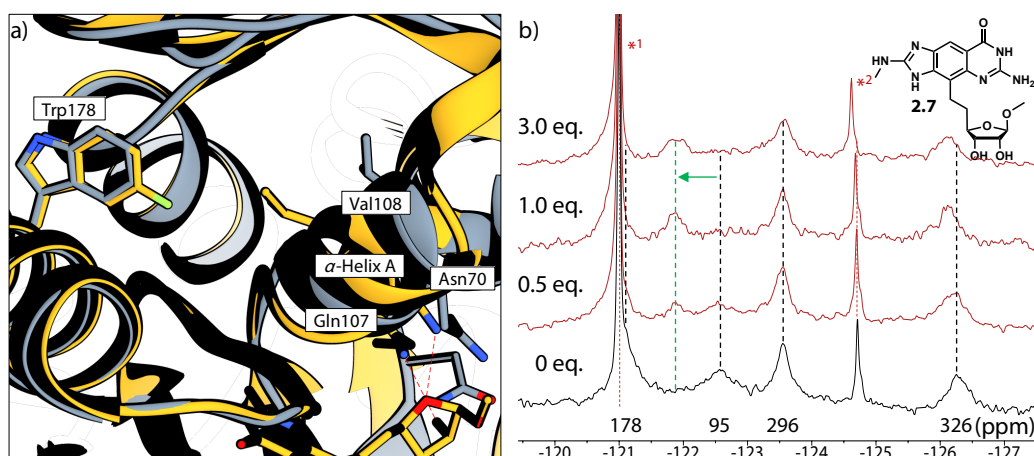


Abbildung 2.23 a) Darstellung der überlagerten *Z. mobilis* Strukturen der Wildtyp-TGT (C_{grau}, PDB Code: 1PUD)^[32] und der fluorierten TGT-Variante (C_{grau}, PDB Code: 6YHD) in Komplex mit **2.7**. **b)** ¹⁹F-NMR-Spektren von TGT_{SFW} mit verschiedenen Äquivalenten von **2.7** in Hochsalz-Puffer. Spektren wurden bei 37 °C und bei 600 MHz ¹⁹F-Frequenz aufgenommen. Verunreinigungen sind mit einem Stern gekennzeichnet (*¹⁻²). *¹ konnte als Fluorid-Ion (F⁻) identifiziert werden. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau, F = grün.

erkennen ist. Dies zeichnet sich hierbei lediglich durch eine chemische Verschiebung von 5F-Trp95 von -122.5 zu -121.9 ppm. Die chemischen Umgebungen von 5F-Trp178 und 5F-Trp326 ändern sich nach Bindung des Liganden nur wenig, so dass eine geringe Verschiebung ins Tieffeld (<0.5 ppm) zu beobachten ist, wohingegen Trp296 keinen chemischen Einfluss durch den Liganden erfährt. Es wird wiederholt gezeigt, dass Trp95 empfindlich auf die Bindung von Liganden reagiert, obwohl kristallographisch keine strukturellen Veränderungen um diesen Rest herum beobachtet werden. Spekulativ kann eine Dynamikänderung des Schleifen-Helix-Motivs durch Bindung des Liganden angenommen werden. Überraschenderweise hat die geänderte Konformation der α -Helix A keinen großen Einfluss auf das ^{19}F -NMR-Spektrum. Wie bereits beschrieben, nimmt Val108 durch die geänderte Anordnung der α -Helix A einen kurzen Kontakt zu 5F-Trp178 auf (~ 4.1 Å, Abbildung 2.23a). Insgesamt darf angenommen werden, dass Ligand **2.7** das Protein in der Geometrie des funktionalen Homodimers bei allen vermessenen Konzentrationen belässt.

Zuletzt wurde der Ligand **2.8** sowohl kristallographisch als auch mittels ^{19}F -NMR untersucht. Der Ligand stellt hierbei strukturell eine Zwischenform zwischen **2.4** und **2.7** dar. In diesem Ligand liegen 2'-OH und 3'-OH geschützt durch Methylgruppen vor. Da beide Furanosyl-Hydroxygruppen methyliert sind, gehen ihre H-Brücken-Donor-Funktionalitäten verloren, was zum Verlust der Interaktionen mit Asn70 und Asp280 führt. Hierdurch nimmt die C(4')-Modifikation eine Konformation ein, die sich von Ligand **2.7** unterscheidet. Die Wechselwirkung zwischen dem endocyclischen Furanosid-Sauerstoff und der Carbamoylgruppe von Gln107 wird dadurch unterbunden, wodurch die α -Helix A ihre gewohnte Konformation

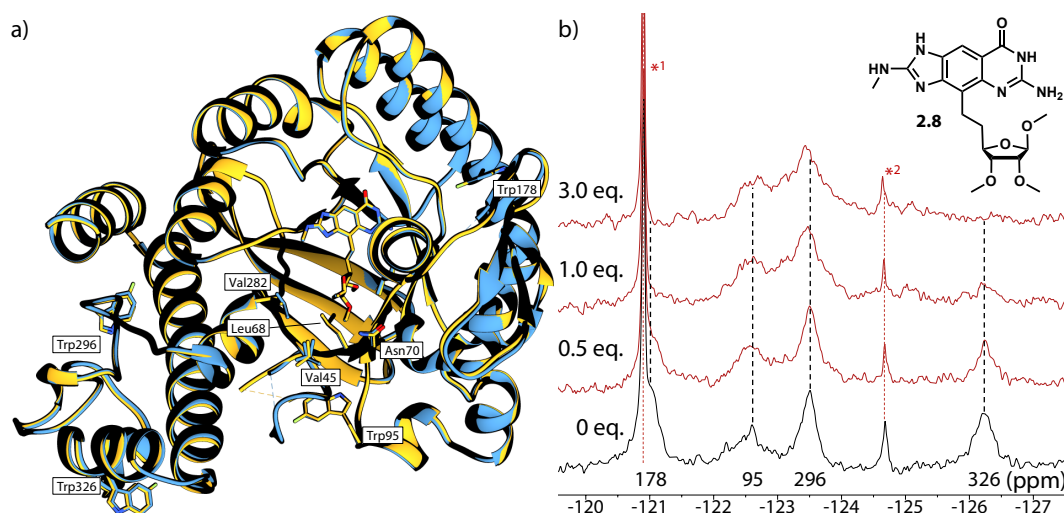


Abbildung 2.24 Darstellung der überlagerten *Z. mobilis* Strukturen der Wildtyp-TGT (C_{blau}, PDB Code: 5LPO)^[41] und fluormarkierter TGT (C_{gelb}, PDB Code: 6YYZ) in Komplex mit **2.8**. **b)** ^{19}F -NMR-Spektren von TGT_{5FW} mit verschiedenen Äquivalenten von **2.8** in Hochsalz-Puffer. Spektren wurden bei 37 °C und bei 600 MHz ^{19}F -Frequenz aufgenommen. Verunreinigungen sind mit einem Stern gekennzeichnet (*¹⁻²). *¹ konnte als Fluorid-Ion (F⁻) identifiziert werden. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau, F = grün.

innerhalb des Proteins einnimmt. Im Gegensatz dazu führt die angefügte C(4')-Gruppe zu kurzen Van-der-Waals-Kontakten zu Val45, Leu68 und Asn70, die aufgrund ihrer räumlichen Verschiebungen zur Desorientierung des Schleifen-Helix-Motivs führen (Abbildung 2.24a).

Die ^{19}F -NMR-Titration von **2.8** zeigt ein ähnliches Verhalten wie die Titration von **2.6** in die fluoridierte TGT. Mit zunehmender Zugabe des Liganden **2.8** nehmen die Intensitäten der Resonanzen von 5F-Trp178 und 326 ab, die sich gleichzeitig in den Bereich -122 bis -124 ppm verschieben. Auf der anderen Seite scheint die Bindung des Liganden in die aktive Tasche die Resonanzen von 5F-Trp95 (-122.6 ppm) und 5F-Trp296 (-123.5 ppm) nicht zu beeinflussen. Ihre chemische Verschiebung ändert sich nur wenig nach Zugabe von 3 eq. **2.8**. Jedoch wird ersichtlich, dass der Bereich um 5F-Trp95 und 5F-Trp296 zunehmend durch verbreiterte Signale von 5F-Trp178 und 326 überlagert wird. Wie im Fall des Liganden **2.6** unterscheiden sich ihre Hauptresonanzen in der chemischen Verschiebung von denen der Liganden (**2.2** - **2.5**, etwa -122.8 und -123.2 ppm), die das kristallographisch "verdrehte" Dimer wiedergeben.

Schließlich wurden die zuvor erstellten Mutanten für die Signalzuweisung (W95F, W178F, W326F) der vier 5F-Trp-Resonanzen verwendet, um sie mit bereits untersuchten Liganden zu titrieren. Hierzu sollte der Einfluss der Tryptophane in Bezug auf die Ligandenbindung untersucht werden. Zu diesem Anlass wurde die Titrationsserie mit den erstellten Trp->Phe-Mutanten bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Bei der gewählten Temperatur von $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hat die ^{19}F -NMR-Messung mehrere Vorteile. Sie sorgt für eine Trennung der Resonanzen zwischen Fluorid-Ion (F^-) und 5F-Trp178, die sich sonst bei der Messung bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ überlagern und führt dadurch zu einer besseren Auswertung hinsichtlich einer ligandinduzierten, chemischen Verschiebung von 5F-Trp178. Nachteilig ist die Auswertung der Resonanz 5F-Trp95, die bereits im Grundzustand des Proteins ohne gebundenen Liganden stark verbreitert vorliegt und daher im Spektrum bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht aufgelöst wird. Darüber hinaus ist die Auftrennung der Signale bei der niedrigen Temperatur unzureichend, sodass sich Resonanzen in engen Bereichen leicht überlagern.

Die Untersuchung der TGT_{5FW}-Mutante W95F mit 3 eq. des Liganden **2.2** wies überraschenderweise keine drastischen Veränderungen in der chemischen Verschiebung der 5F-Trp-Signale von Trp178 und Trp326 auf (Abbildung 2.25). Wie erwartet, wird bei einer Mess-temperatur von $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine Trennung von zwischen Fluorid-Ion (1) und 5F-Trp178 beobachtet (Abbildung 2.25a). Insgesamt zeigt dies, dass der Ligand **2.2**, in Abwesenheit von Trp95, nicht in der Lage ist, das "verdrehte" Dimer in Lösung zu induzieren. Dennoch zeigt eine genauere Betrachtung der NMR-Messung bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine Verbreiterung der Resonanz von 5F-Trp296 und deutet auf eine leichte Beeinflussung der Proteindynamik dieser Proteinvariante (Abbildung 2.25b, siehe Pfeil). Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass dieser Rest für die thermische Stabilität und für den Erhalt des Schleifen-Helix-Motivs an der Dimer-Grenzfläche

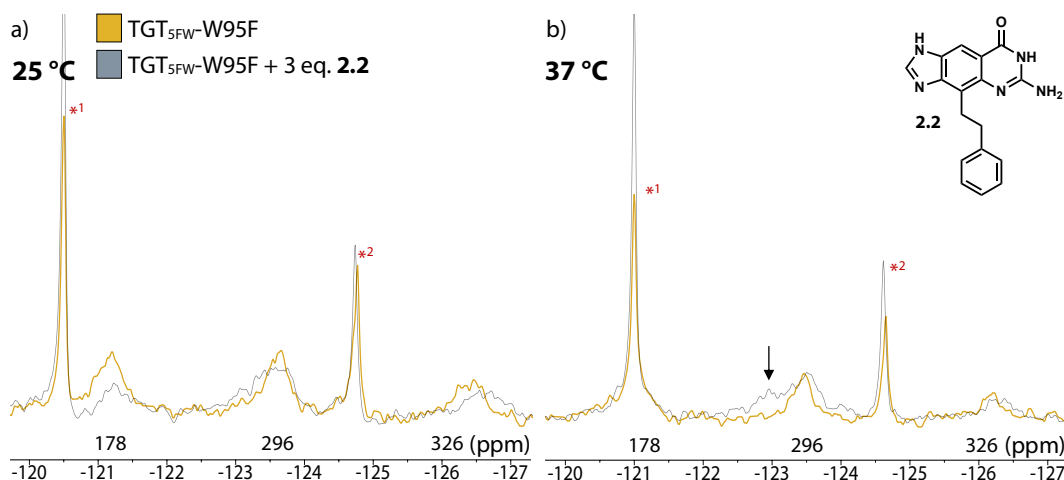


Abbildung 2.25 Überlagerte ^{19}F -NMR-Spektren von TGT_{5FW}-W95F und in Titration mit 3 eq. von 2.2 in Hochsalz-Puffer. Spektren wurden bei **a)** 25 °C und **b)** 37 °C bei 600 MHz ^{19}F -Frequenz aufgenommen. Verunreinigungen sind mit einem Stern gekennzeichnet (*¹⁻²). *1 konnte als Fluorid-Ion (F^-) identifiziert werden.

essentiell ist. Daher hat Trp95 vermutlich eine Schlüsselfunktion in der Regulierung des Dimerzustandes durch Steuerung des Schleifen-Helix-Motivs. Eine nähere Untersuchung von Trp95 wäre sehr interessant, um die Funktion des Indolrings im Zentrum des Schleifen-Helix-Motivs aufzuklären.

Zu der Proteinvariante TGT_{5FW}-W178F wurde 3 eq. von Ligand 2.7 hinzutitriert (Abbildung 2.26). Die Ligandgeometrie ist, wie vorher beschrieben, nicht in der Lage das Schleifen-Helix-Motiv mit ihrer angefügten C(4')-Modifikation zu beeinträchtigen. Die Messung zeigte daher nur eine chemische Verschiebung der 5F-Trp-Resonanz von Trp95 ins Tieffeld (ca. 0.7 ppm,

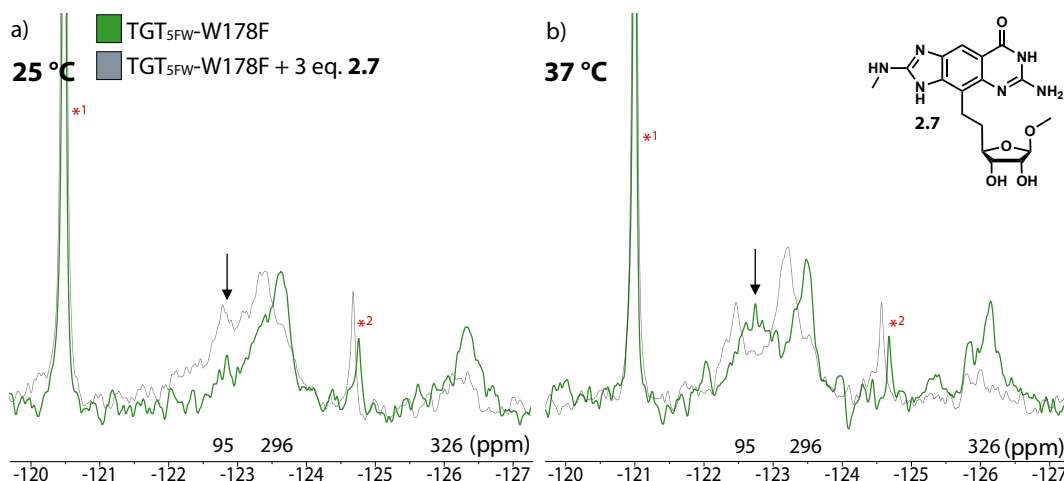
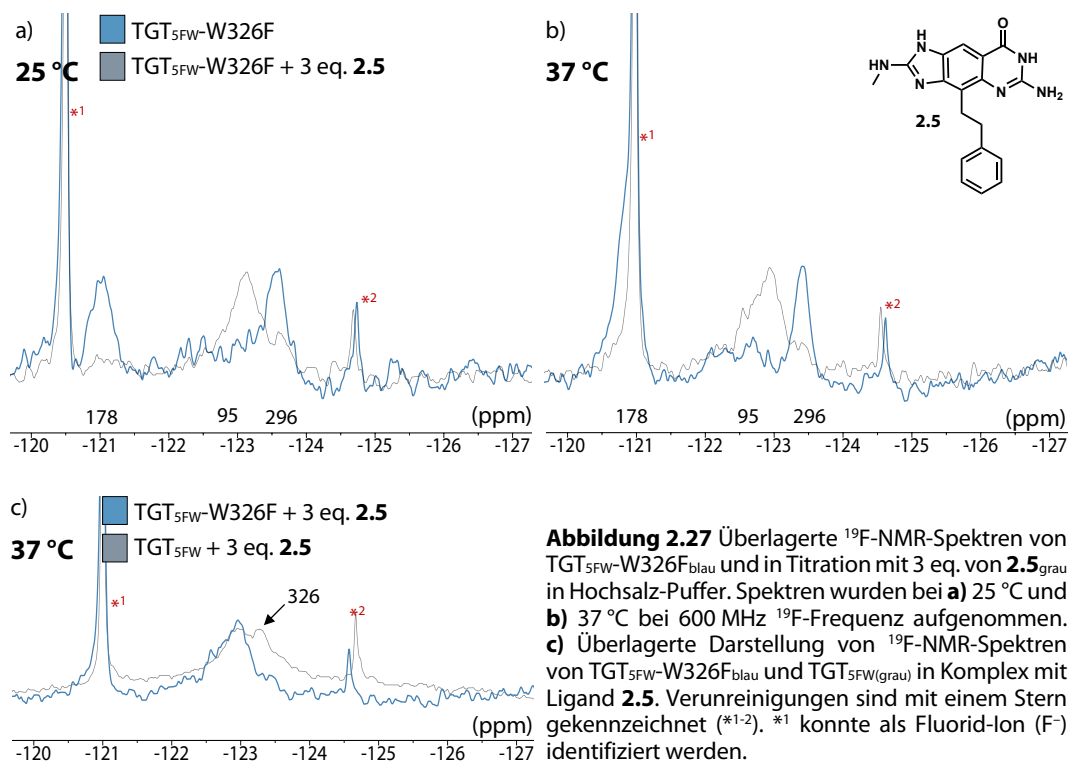


Abbildung 2.26 Überlagerte ^{19}F -NMR-Spektren von TGT_{5FW}-W178F und in Titration mit 3 eq. von 2.7 in Hochsalz-Puffer. Spektren wurden bei **a)** 25 °C und **b)** 37 °C bei 600 MHz ^{19}F -Frequenz aufgenommen. Verunreinigungen sind mit einem Stern gekennzeichnet (*¹⁻²). *1 konnte als Fluorid-Ion (F^-) identifiziert werden.

Abb. 2.22 und 2.23). Überraschenderweise induziert der Ligand **2.7** in der TGT-Mutante TGT_{5FW}-W178F nicht die erwartete chemische Verschiebung von 5F-Trp95. Im Gegensatz zum Wildtyp-Protein (TGT_{5FW}) weist das Rohspektrum von TGT_{5FW}-W178F bereits im ungebundenen Zustand eine definierte Intensität der Resonanz von 5F-Trp95 (siehe Pfeile). Scheinbar stabilisiert die eingeführte Mutation die Position von 5F-Trp95 und verändert insgesamt das Bindungsverhalten der Proteinvariante. Die Schmelzpunktbestimmung von TGT_{5FW}-W178F wies eine verminderte Thermostabilität ($\Delta T_m [\text{WT} \rightarrow \text{W178F}] = -2.6\text{ }^\circ\text{C}$) im Vergleich zum unmodifizierten Wildtyp (TGT_{5FW}) auf, was jedoch nicht das Bindungsverhalten von **2.7** erklären kann.

Zuletzt wurde die Titration von 3 eq. von Ligand **2.5** in die Proteinvariante TGT_{5FW}-W326F untersucht (Abbildung 2.27a/b). Die eingeführte Mutante wurde in **Kapitel 5** vertieft untersucht. Sie zeigt keine strukturellen Unterschiede zum Wildtyp und die entfernte H-Brücke zwischen Trp326 und der Carbonylgruppe von Met93' des Dimerpartners führt zu keiner thermischen Instabilität des Homodimers. Dies spiegelt sich auch in der unveränderten Enzymkinetik der Proteinvariante im Vergleich zum Wildtyp-Protein wider und zeigt, dass der Rest, mit Ausnahme der Aromatizität, stabilitätsmäßig entbehrlich ist. Dementsprechend zeigte die Zugabe von **2.5** in TGT_{5FW}-W326F die gleichen chemischen Verschiebungen wie bei der Titration zu TGT_{5FW} (siehe Abb. 2.20) und zeigt, dass die Hauptintensität bei -123.3 ppm im "verdrehten Dimer" auf die Resonanz von 5F-Trp326 zurückzuführen ist (Abbildung 2.27c).



2.5 Zusammenfassung

Die proteinbeobachtete ^{19}F -NMR (PrOF-NMR) wurde auf das System der *Z. mobilis* TGT angewendet. Durch langwierige Optimierungsprozesse konnte die $\text{TGT}_{5\text{FW}}$ mittels metabolischer Markierung mit einer ausgezeichneten Einbaurate von 5-Fluor-L-tryptophan erhalten werden. Die angewandten biophysikalischen Charakterisierungsmethoden zeigen, dass der Einbau von 5-Fluor-L-tryptophan an vier Positionen die strukturellen Eigenschaften des Proteins nicht modifiziert und ideal als chemische Sonde für strukturelle Veränderungen in Lösung unter Zugabe von Liganden eingesetzt werden kann. Nach Titration verschiedener Liganden werden die vier unterschiedlich platzierten Fluorkerne im Protein durch Veränderungen in der chemischen Umgebung beeinflusst, die sich in der chemischen Verschiebung der einzelnen Resonanzen widerspiegeln. Die durch PrOF-NMR bestimmten NMR-Spektren korrelieren mit den durch Röntgenkristallographie bestimmten Strukturmerkmalen überein. Insbesondere die Liganden **2.2** – **2.4**, die bisher das kristallographisch nachweislich "verdrehte" Dimer induzieren, weisen strukturelle Ähnlichkeiten in der Kristallstruktur mit dem funktional aktiven Protein (*C2*-Raumgruppe) auf. So stellt die Destabilisierung der Strukturmerkmale α -Helix A, Schleifen-Helix-Motiv und die "verdrehte" Anordnung von Trp326 ein außergewöhnliches Muster für die abgeschwächte Dimer-Grenzfläche dar. Durch schrittweise Titration dieser Liganden und der verwandte Struktur **2.5** zeigen die ^{19}F -NMR-Spektren beginnend mit den Resonanzen der vier Fluoratome an den Trp im ligandfreien Zustand eine einzigartige chemische Verschiebung der vier Resonanzen (5F-Trp95/178/296 und 326) zu einem neuen veränderten Muster. Offenbar löst die ligandinduzierte gleichzeitige Destabilisierung beider Strukturelemente den Prozess des "Verdrehens" des Dimers verstärkt aus, wodurch auch die Kristallisation in dieser Packung mit den Liganden **2.2** – **2.4** erleichtert wird.

Nichtsdestotrotz sind die Liganden **2.5**, **2.6** und **2.8** ebenfalls in der Lage die Umlagerung des Dimers in Lösung zu regulieren. Insgesamt zeigen alle Liganden durch geeigneten sterischen Druck auf die Reste Val45, Leu68, Asn70 und Val282 im unteren Teil der Ribose-34-Tasche einen Effekt in allen angewandten Untersuchungsmethoden. Durch die Bindung der Liganden wird über eine Kaskade der genannten Aminosäure eine ligandinduzierte Destabilisierung des Schleifen-Helix-Motivs verursacht, wodurch eine leichte Verkipfung eines Monomers zum Dimerpartner ausgelöst wird. Die Kristallisation dieser destabilisierten Dimervarianten spiegelt sich in einer um etwa 6 Å verkürzten α -Achse und einer Reduzierung des β -Winkels um etwa 2° der Einheitszellparameter in der *C2*-Raumgruppe wider. Zudem zeigten frühere Untersuchungen zur Bestimmung der Bindungsaffinität mittels isothermer Titrationskalorimetrie, dass die Bindung dieses Ligandentyps vollständig entropisch getrieben ist, was auf die Destabilisierung des Schleifen-Helix-Motivs zurückzuführen ist.^[57] Gepaart mit diesen Informationen, zeigen die in dieser Studie gemessenen ^{19}F -NMR-Spektren aller destabilisierenden Liganden der Dimer-Grenzfläche ein gemeinsames Muster in der chemischen Verschiebung aller vier

Fluorresonanzen. Dies zeichnet sich vorwiegend durch eine enorme Verschiebung der beiden Fluorsignale 5F-Trp178 (~1.7 ppm) sowie 5F-Trp326 (~3.2 ppm) in den Bereich zwischen den Resonanzen von 5F-Trp95 und 5F-Trp296 aus. Im Gegensatz zur Röntgenkristallographie, die die Endpunkte des Umlagerungsprozesses markiert, detektiert die ^{19}F -NMR-Spektroskopie in Lösung das gemittelte Signal aller möglichen Zustände des Dimers im dynamischen Gleichgewicht und zeigt, dass die untersuchten Liganden die Fähigkeit besitzen, die Dimeranordnung in Lösung umzustrukturieren.

Es fällt auf, dass die Resonanz von 5F-Trp95 in dieser Studie mehrere ungewöhnliche Eigenschaften aufwies. Zunächst zeigt das Rohspektrum des ligandfreien Proteins von TGT_{5FW} ein deutlich verbreitertes Signal in Gegensatz zu den anderen drei Fluorresonanzen. Die Positionierung dieses Restes liegt vergraben inmitten des hochflexiblen Schleifen-Helix-Motiv, welches den aromatischen *Hot Spot* vor Zugang zu Lösungsmittel schützt (siehe auch **Kapitel 5**). Aufgrund der bereits im unkomplexierten Protein vorliegenden Dynamik an diesem Motiv, könnte eine Erklärung für die starke Verbreiterung der Resonanz abgeben. Weiterhin überrascht die eingeführte Mutation W95F in Bezug zur thermischen Stabilität der Proteinvariante. Mit einer Absenkung von 15.5 °C ist eine deutliche Destabilisierung dieser TGT-Variante zu beobachten. Untersuchte Kristallstrukturen dieser Proteinvariante zeigen bei pH 5.5, dass der Ersatz des Tryptophan-Rests zu Phenylalanin eine vollständige Unordnung des Schleifen-Helix-Motivs auslöst. Innerhalb des zuvor erwähnten Motivs wechselwirkt der Rest vorwiegend über hydrophobe Kontakte zu den umgebenen Resten des Motivs. Durch die Trp->Phe-Mutation wird eine H-Brücke zur Carbonylgruppe des benachbarten Pro98-Restes vollständig entfernt. Scheinbar stellt der abnehmende Volumenbedarf des Phenylrest in dieser Position eine Abschwächung der Fixierung des Schleifen-Helix-Motivs dar. Die strukturellen Eigenschaften spiegeln sich zudem in den Ergebnissen der nativen Massenspektrometrie wider, die 51% Monomeranteil bei 1 µM Untereinheitenkonzentration nachweist. Die Titrationen von **2.1** bzw. **2.7** wiesen ebenfalls Abweichungen zu den Kristallstrukturen auf. Beide Liganden sollten nach diesen Strukturen nicht in der Lage sein, das Schleifen-Helix-Motiv in Folge kurze Van-der-Waals-Kontakte zu stören. Dennoch wird in Lösung einzig eine chemische Verschiebung von 5F-Trp95 beobachtet und deutet so auch für **2.1** und **2.7** auf eine ligandinduzierte Änderung der Dynamik an diesen Rest. Zuletzt überraschte die Titration von **2.2** zu der TGT_{5FW}-W95F-Variante. Ohne die eingeführte Mutation zu Phe erzwingt der Ligand eine Veränderung in den chemischen Verschiebungen aller vier Resonanzen, die bei Vorliegen der Mutation allerdings nicht mehr auftritt. All diese Anzeichen deuten darauf hin, dass Trp95 eine regulative Funktion zur Proteinstabilität und Steuerung des Umlagerungsprozesses trägt.

Zusammenfassend wird am Beispiel der TGT verdeutlicht, dass sich die PrOF-NMR ideal für den Einsatz in der Strukturanalyse von Dimeren eignet und vor allem, wenn die Spektroskopie in Lösung durch weitere biophysikalische sowie strukturelle Untersuchungsmethoden flankiert

wird. Insbesondere konnten in dieser Studie ligandinduzierte Strukturänderung am Protein detektiert werden. Die eingefügten Fluorsonden reagieren empfindlich auf Änderungen der chemischen Umgebung und decken Details in den durchaus abweichenden Bindungscharakteristiken von strukturell variierten Liganden auf.

2.6 Methoden

Die verwendeten Materialien, Chemikalien, Laborgeräte und Puffer sind in **Kapitel 6** aufgeführt. Allgemeine Methoden, sofern nicht in diesem Kapitel erwähnt, werden ebenfalls in **Kapitel 6** beschrieben.

2.6.1 Gezielte Mutagenese durch PCR

Die gezielte Mutagenese wurde, wie in 6.6.1 beschrieben, durchgeführt.

2.6.2 Proteinexpression und Reinigung von Fluor-markierten TGT Varianten

Zunächst wurden Zellen in einer Vorkultur (200 mL, LB-Medium, 0.1% (v/v) Ampicillin, 37 °C, 140 rpm) über Nacht angezüchtet, 25 mL dieser Vorkultur in eine Hauptkultur (2 L, LB-Medium, 0.1% (v/v) Ampicillin, 37 °C, 140 rpm) überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 inkubiert. Nach Erreichen der OD₆₀₀ wurde das LB-Medium durch Zentrifugation (10000 rpm, 4 °C, 10 min; *Avanti J-25*, BECKMAN COULTER) entfernt und der Rückstand in 2 L MJ9-Mediums suspendiert. Die Kultur wurde anschließend für 2 h bei 24 °C inkubiert und anschließend mit 5-Fluor-DL-tryptophan (100 mg L⁻¹) versetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 min wurde die Überexpression durch Induktion mittels IPTG bei einer Endkonzentration von 1 mM bei 17 °C und 140 rpm über Nacht gestartet. Das MJ9-Medium wurde durch Zentrifugation (10000 rpm, 4 °C, 10 min; *Avanti J-25*, BECKMAN COULTER) entfernt und das gewonnene Zellpellet in Lysepuffer (25 mL pro 1 L MJ9 Medium) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (4 x 4 min, 4 °C, *Duty Cycle* 30%, *Output Control* 7; *Sonifiere 250*, BRANSON). Zur Trennung der unlöslichen Bestandteile wurde die Suspension zentrifugiert (20000 rpm, 4 °C, 60 min; *Avanti J-25*, BECKMAN COULTER) und das Lysat entnommen.

Die säulenchromatographische Reinigung (*ÄKTA_{prime} plus/ÄKTA_{FPLC}*; AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) erfolgte über zwei Schritte. Zunächst wurde das Lysat auf einen Anionenaustauscher (Puffer A äquilibriert; *Highload Q-Sepharose*[™], GE HEALTHCARE) mit einer Geschwindigkeit von 3.5 mL min⁻¹ aufgetragen. Darauffolgend wurde ein Waschschritt mit Puffer A durchgeführt und das Protein mit anschließender fraktionierter Elution mit einem Gradienten von 0% – 40% Puffer B gegen Puffer A vorgereinigt erhalten. Mittels SDS-PAGE identifizierte TGT-enhaltende Fraktionen wurden vereinigt und auf die *Strep-Tactin[®]XT-Superflow* Säule (Puffer W1 äquilibriert; IBA) mit einer Geschwindigkeit von 2.0 mL min⁻¹ aufgetragen. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen von Nukleinsäuren wurde ein Waschschritt mit Puffer W1 (zehnfaches Säulenvolumen) durchgeführt. Adsorbiertes Protein wurde mit Puffer E1 bis zum erneuten Erreichen der Basislinie eluiert und in Hochsalz-Puffer (1:1) aufgefangen. Zur Entfernung von in Puffer E1 enthaltenem Biotin wurden die vereinigten

Fractionen mit Hilfe eines Konzentrators (*Vivaspin* 30 kDa; 3500 rpm, 4 °C, *Multifuge 3SR*, HERAEUS) auf Hochsalz-Puffer äquilibriert.

Der *Strep-tag^{®II}* wurde mittels Thrombin (*Thrombin Cleavage Capture Kit*, NOVAGENE[®]) abgetrennt. Hierzu wurde nach Herstellerangaben Proteinlösung und Thrombin für 18 h bei Raumtemperatur inkubiert, das biotinylierte Thrombin, sowie der abgespaltene *Strep-tag^{®II}* durch Zugabe von Streptavidin-Agarose gebunden und durch Filtration (je 500 g, 4 °C, 1 min; 1-14K, SIGMA) abgetrennt. Die aufgearbeitete Proteinlösung wurde zur gewünschten Konzentration von 12 mg mL⁻¹ eingengt und nach Schockfrierung bei -80 °C aufbewahrt.

Wildtyp TGT Protein zur Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen wurde nach Abschnitt 3.6.1 hergestellt.

2.6.3 Analytische Größenausschluss-Chromatographie

Zur analytischen Größenausschluss-Chromatographie wurde die *Superdex[™] 200 Increase 10/300 GL* verwendet. 10 µM Protein wurden mit einem Gesamtvolumen 100 µL auf die Säule beladen und der Lauf mit einem Gesamtvolumen von 30 µL wurde mit 0,5 mL min⁻¹ in Hochsalzpuffer durchgeführt. Die Auswertung wurde mit Hilfe von *Excel* (MICROSOFT) durchgeführt.

2.6.4 Thermal-Shift-Assay

Die Messung der Schmelzpunktwerte wurde, wie in Abschnitt 5.6.9 beschrieben, durchgeführt. In Abbildung S 5.2 sind die Rohdaten der Messungen für TGT_{WT} und TGT_{5FW} abgebildet. Die Rohdaten für TGT_{5FW}-W178F sind in Abschnitt 2.8 dargestellt.

2.6.5 ¹⁹F-NMR-Spektroskopie

¹⁹F-NMR-Messungen wurden an einem 600 MHz *A VANCE III*-NMR-Spektrometer (BRUKER) durchgeführt, das mit einem Quadrupelresonanz-Probenkopf (¹H/¹³C/¹⁵N/¹⁹F-QXI) sowie getrennten 100 W-Sendern für ¹H und ¹⁹F ausgestattet ist. ¹H-*inverse gated*-entkoppelte ¹⁹F-Spektren wurden mit dem Pulsprogramm *zgig* (1.11, 2012/01/31) aus der BRUKER-Programmbibliothek aufgenommen.

Typische Messparameter: 8k Datenpunkte, Akquisitionsdauer AQ 181 ms, spektrale Breite SW 40 ppm, Transmitterfrequenz für ¹⁹F O1P -120 ppm, 90°-Pulslänge 19,5 µs / 50 W; ¹H-Entkopplung mit DIPSI2-Sequenz und 90°-Pulslänge 140 µs / 0.347 W; Anzahl der *scans* NS 16k, Messzeit 5 h 31 min.

Die Proben temperatur ist auf 99.8% CH₃OH geeicht (Genauigkeit < 0.1 °K für 280-330 K); ppm-Werte für ¹⁹F sind indirekt mittels der δ -Werte auf ¹H geeicht und entsprechend einem Referenzwert auf 0 ppm für reines CFCl₃ kalibriert.^[78]

2.6.6 Kristallisation und Kokristallisation von (Fluor-markierten) TGT-Varianten mit *lin*-Benzoguaninen zur Adressierung der 34-Ribose-Tasche

TGT Kristalle wurden unter der Verwendung der *Hanging-Drop Vapour Diffusion*-Methode innerhalb weniger Tage bei 18 °C erhalten. Protein-Derivate wurden bei einer Konzentration von 12 mg mL⁻¹ und bei einem pH 5.5 (100 mM MES pH 5.5, 0.5 mM DTT, 10% (v/v) DMSO, 13% (w/v) PEG8000) kristallisiert. Zur Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen wurde Ligand (in DMSO) und Protein (in Hochsalz-Puffer) miteinander vermischt. Die erhaltene Proteinlösung (16% DMSO) mit einer zu untersuchenden Konzentration von 3.2 mM Ligand Proteinlösung und Kristallisationspuffer wurden im gleichen Anteil an Volumina (je 1 µL) auf ein Deckglas zusammengegeben und gegebenenfalls durch leichte Variation des Volumenverhältnisses zueinander optimiert. Weitere Verbesserungen konnten in Kombination durch Erniedrigung der Protein- oder PEG8000-Konzentration weiterhin erzielt werden. Die Kristallisation von **TGT_{5FW}^{C2}·2.1** wurde mit einer finalen Liganden-Konzentration von 0.32 mM durchgeführt. Im Fall von **TGT_{WT}^{P2}·2.5** wurde eine Liganden-Endkonzentration von 2.4 mM und bei **TGT_{5FW}^{C2}·2.4** 1.6 mM verwendet. Zur Kristallisation von **TGT_{WT}^{C2}·2.2** wurde eine initiale Proteinkonzentration von 31 mg mL⁻¹, einer finalen Konzentration von 1.6 mM Ligand und einem Volumenverhältnis von 1:2 zwischen Protein-Ligand-Lösung zu Reservoir gewählt. Hochwertige Kristalle von **TGT_{WT}^{C2}·2.6** und **TGT_{5FW}^{C2}·2.6** konnten nur durch Erniedrigung der Ligandenkonzentration zu einer finalen Konzentration zu 0.8 mM erhalten werden. Reservoirvertiefungen wurden mit 650 µL des Kristallisationspuffers befüllt und die Deckgläser mit Hilfe von Silikonfett versiegelt.

2.6.7 Datensammlung und Prozessierung

Datensätze der Kristallstrukturen (Tabelle S 2.1) wurden am Elektronenspeicherring BESSY II (Helmholtz-Zentrum Berlin, Deutschland) an der *Beamline* 14.1 mit einem DECTRIS *Pilatus 6M* Detektor bei einer Wellenlänge von 0.9184 Å und 100 K aufgenommen. Vor der Datenerfassung wurden die Kristalle für einige Sekunden in den Cryo-Puffer A überführt und im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Erhaltene Diffraktionsbilder wurden mit Hilfe von *XDS*^[79] indiziert, prozessiert und skaliert. Die Überführung der Reflektionsdatei *XDS_ASCII.HKL* in das MTZ-Format wurde mit *XDSCONV* durchgeführt und eine Teilmenge von zufällig ausgewählten 5% aller Reflexe zur *R_{free}*-Wert Berechnung verwendet. Alle in diesem Projekt erhaltenen Datensätze mit Ausnahme

der Struktur **TGT_{WT}^{P2}·2.5** wurden in der monoklinen Raumgruppe *C2* prozessiert mit einem TGT-Monomer pro asymmetrischer Einheit und einem Matthews-Koeffizienten 2.3 oder 2.4 Å³ Da⁻¹. **TGT_{WT}^{P2}·2.5** kristallisiert in der *P2*-Raumgruppe, in welcher sich zwei Monomere pro asymmetrische Einheit (Matthews-Koeffizient: 2.3 Å³ Da⁻¹) befinden.

2.6.8 Strukturbestimmung, Verfeinerung und Analyse

Die Phasen der Kristallstrukturen wurde durch die Anwendung des molekularen Ersatzes mit Hilfe des Moduls *Phaser*^[80] aus *CCP4*^[81] bestimmt. Als Suchmodell diente die in der PDB-Bank hinterlegte Kristallstruktur mit dem Code 1PUD^[32]. Zwischen den Verfeinerungszyklen mit *phenix-refine* (1.16_3549)^[82] wurde *Coot*^[83] zur Modellbuanpassung verwendet. *Simulated Annealing* mit Standard Einstellungen wurden zunächst durchgeführt, gefolgt von weiteren Zyklen mit *Coorindate xyz*, *Occupancy*. *B*-Werte wurden in den Datensätzen **TGT_{5FW}^{C2}·2.2** und **TGT_{WT}^{C2}·2.2** isotrop sowie zudem mit TLS (*Translation, Liberation, Screw*, Auswahl durch implementierte Funktion in Phenix (1.16_3549)) verfeinert. In den Datensätzen **W326F_{5FW}^{C2}**, **TGT_{5FW}^{C2}·2.4**, **TGT_{WT}^{P2}·2.5** und **TGT_{5FW}^{C2}·2.5** wurden die Proteinketten anisotrop verfeinert, wohingegen Wasser und Lösungsmoleküle isotrop behandelt wurden. Zuletzt wurden alle Atome in **TGT_{5FW}^{C2}**, **W95F_{5FW}^{C2}**, **W178F_{5FW}^{C2}**, **TGT_{5FW}^{C2}·2.1**, **TGT_{5FW}^{C2}·2.3**, **TGT_{5FW}^{C2}·2.5**, **TGT_{WT}^{C2}·2.6**, **TGT_{5FW}^{C2}·2.6**, **TGT_{5FW}^{C2}·2.7** und **TGT_{5FW}^{C2}·2.8** anisotrop verfeinert. Strukturen mit anisotroper Verfeinerung wurden anschließend mit Wasserstoffatomen als *riding hydrogens* versetzt, jedoch Wasserstoffe von vorliegenden Lösungsmittelmoleküle und Ligand entfernt. Alternative Seitenkettenkonformationen, fehlende Aminosäuren, Wassermoleküle wurden in wohldefinierte mF_o-DF_c-Elektronendichte eingebaut und während der Verfeinerung beibehalten, wenn sie in einer 2F_o-F_c-Elektronendichte wiedergefunden wurden und die Besetzung größer als 20% war (alternative Seitenkettenkonformationen und Liganden). Nur Wassermoleküle, die nach der Verfeinerung durch eine 2F_o-F_c Elektronendichte von $\sigma < 1.0$ RMSD, einen *B*-Faktor nicht signifikant größer als 55 Å² und Abstände zwischen 2.3 Å und 3.5 Å zu umgebenden Atomen aufwiesen, wurden in der Struktur beibehalten. Die grafische Darstellung der Kristallstruktur-Koordinaten und Elektronendichte-Karten erfolgte mit *Chimera*^[84].

2.7 PDB Zugangscodes

Koordinaten, sowie Strukturfaktoren von TGT_{WT/5FW}^{space group} Varianten mit diversen Liganden wurden in der *RCSB Protein Data Bank* (PDB) mit den Zugangscodes **TGT_{5FW}^{C2}** (6YGP), **W95F_{5FW}^{C2}** (6ZGM), **W178F_{5FW}^{C2}** (6YGK), **W326F_{5FW}^{C2}** (6YGL), **TGT_{5FW}^{C2}·2.1** (6YH2), **TGT_{5FW}^{C2}·2.2** (6YGZ), **TGT_{WT}^{C2}·2.2** (6YGR), **TGT_{5FW}^{C2}·2.3** (6YGX), **TGT_{5FW}^{C2}·2.4** (6YHE),

$\text{TGT}_{\text{WT}}^{\text{P2}} \cdot 2.5$ (6YIQ), $\text{TGT}_{5\text{FW}}^{\text{C2}} \cdot 2.5$ (6YH3), $\text{TGT}_{\text{WT}}^{\text{C2}} \cdot 2.6$ (6YGS), $\text{TGT}_{5\text{FW}}^{\text{C2}} \cdot 2.6$ (6YH1), $\text{TGT}_{5\text{FW}}^{\text{C2}} \cdot 2.7$ (6YHD) und $\text{TGT}_{5\text{FW}}^{\text{C2}} \cdot 2.8$ (6YYZ) hinterlegt.

2.8 Hintergrundinformationen

2.8.1 *Thermal-Shift*-Assay

Rohspektren TSA und deren 1. Ableitung

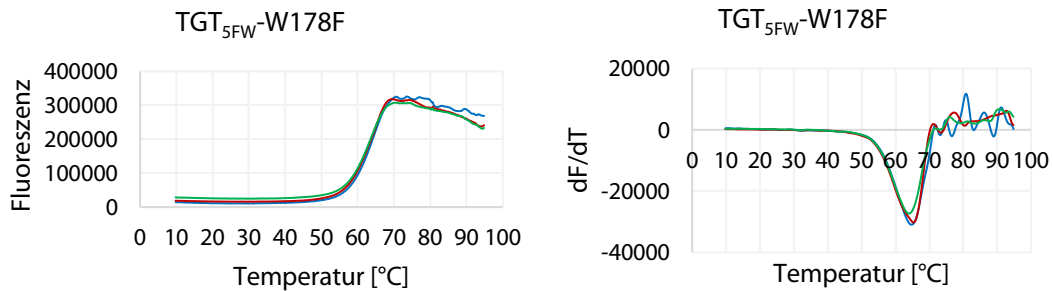


Abbildung S 2.1 Links: Schmelzkurve von $\text{TGT}_{5\text{FW}}\text{-W178F}$ im *Thermal-Shift*-Assay. Aufgetragen ist die gemessene Fluoreszenz in Hochsalz-Puffer gegen die Temperatur. Die Fluoreszenz entsteht durch die Zugabe des fluoreszenten Farbstoffs *SYPRO™ Orange*, der an hydrophobe Aminosäuren bindet. **Rechts:** Auftragung der ersten Ableitung einer Schmelzkurve gegen die Temperatur. Das Minimum entspricht dem Schmelzpunkt des Proteins, das in der Schmelzkurve vermessen wurde.

2.8.2 Kristallographische Tabelle

Tabelle S 2.1 Datensammlung und Verfeinerungsstatistik für die TGT Kristallstrukturen innerhalb dieses Kapitels. TGT_{5FW} bezeichnet Strukturen, die mit 5FTrp anstatt regulärem Trp (WT) markiert sind.

TGT _{WT/5FW} ^{space group} PDB ID	Chapter.Ligand	TGT _{5FW} ^{C2} 6YGP	W95F _{5FW} ^{C2} 6YGM	W178F _{5FW} ^{C2} 6YGW	W326F _{5FW} ^{C2} 6YGL
(A) Data collection and processing					
Collection site		BESSY 14.1	BESSY 14.1	BESSY 14.1	BESSY 14.1
No. crystals used		1	1	1	1
Wavelength λ [Å]		0.91841	0.91841	0.91841	0.91841
Space group		C2	C2	C2	C2
Unit cell parameters					
a [Å]		90.8	84.5	90.3	91.1
b [Å]		65.1	65.0	65.3	65.2
c [Å]		70.6	71.3	70.1	70.7
β [°]		96.1	94.0	96.0	96.1
(B) Diffraction data					
Resolution range [Å]		45.16 – 1.33 (1.41 – 1.33)	42.56 – 1.23 (1.31 – 1.23)	44.9 – 1.16 (1.23 – 1.16)	45.31 – 1.48 (1.57 – 1.48)
Unique reflections		90420 13633	107419 16748	130261 19851	66504 10258
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]		3.2 (36.7)	3.8 (49.9)	3.7 (20.1)	3.9 (43.6)
Completeness [%]		96.2 (90.3)	97.5 (94.6)	92.9 (88.0)	97.4 (93.4)
Redundancy		3.1 (2.9)	3.8 (3.7)	4.7 (4.8)	2.8 (2.7)
$I/\sigma(I)$		17.0 (2.4)	16.1 (2.4)	21.2 (5.8)	15.1 (2.0)
Wilson B-factor [Å ²]		15.7	14.3	11.6	18.1
Matthews Coefficient [Å ³ ·Da ⁻¹] ^[a]		2.4	2.3	2.4	2.4
Solvent content [%] ^[a]		49.0	45.8	48.6	49.3
Molecules in asymmetric unit		1	1	1	1
(C) Refinement with Phenix					
PHENIX version		1.16_3549	1.16_3549	1.16_3549	1.16_3549
Resolution range [Å]		45.2 – 1.33	42.2 – 1.23	44.9 – 1.16	45.3 – 1.48
Reflections used for R_{free}		4521	5371	6513	3326
Reflections used for R_{work}		85899	102047	123748	63177
Final R values					
R_{free} [%]		14.8	16.0	13.2	16.4
R_{work} [%]		12.1	13.6	11.4	13.2
No. of atoms (non-hydrogen)					
Protein atoms		2909	2786	3015	2860
Water molecules		377	334	414	351
Ligand atoms		0	0	0	0
RMSD from ideality					
Bond angles [°]		1.0	0.9	1.0	1.0
Bond length [Å]		0.007	0.007	0.007	0.007
Ramachandran plot^[b]					
Most favoured regions [%]		95.8	95.7	95.3	95.8
Additionally allowed regions [%]		3.8	4.0	4.4	3.8
Generously allowed regions [%]		0.3	0.3	0.3	0.3
Mean B-factors [Å²]^[c]					
Protein atoms		21.2	21.4	17.2	24.0
Water molecules		35.5	35.0	31.4	33.8
Ligand atoms		-	-	-	-

TGT _{WT/SFW} ^{space group} .Chapter.Ligand PDB ID	TGT _{SFW} ^{C2} .2.1 6YH2	TGT _{SFW} ^{C2} .2.2 6YGZ	TGT _{WT} ^{C2} .2.2 6YGR	TGT _{SFW} ^{C2} .2.3 6YGX
(A) Data collection and processing				
Collection site	BESSY 14.1	BESSY 14.1	BESSY 14.1	BESSY 14.1
No. crystals used	1	1	1	1
Wavelength λ [Å]	0.91841	0.91841	0.91841	0.91841
Space group	C2	C2	C2	C2
Unit cell parameters				
a [Å]	90.7	84.8	83.9	85.1
b [Å]	65.3	64.9	65.0	65.0
c [Å]	70.9	71.3	71.1	71.4
β [°]	96.1	94.1	93.9	93.8
(B) Diffraction data				
Resolution range [Å]	45.10 – 1.19 (1.26 – 1.19)	42.60 – 1.86 (1.97 – 1.86)	42.46 – 1.71 (1.81 – 1.71)	42.6 – 1.35 (1.44 – 1.35)
Unique reflections	130634 20398	30851 4582	40707 6285	81422 12527
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	4.1 (48.7)	6.4 (48.9)	5.1 (49.9)	3.8 (38.5)
Completeness [%]	98.6 (95.8)	94.5 (87.1)	97.5 (93.4)	92.9 (88.0)
Redundancy	3.7 (3.6)	3.7 (3.8)	3.4 (3.4)	2.9 (2.9)
$I/\sigma(I)$	14.8 (2.2)	14.3 (2.5)	15.3 (2.2)	13.9 (2.1)
Wilson B-factor [Å ²]	13.1	22.5	21.7	17.1
Matthews Coefficient [Å ³ ·Da ⁻¹] ^[a]	2.4	2.3	2.3	2.3
Solvent content [%] ^[a]	49.3	45.9	45.4	46.2
Molecules in asymmetric unit	1	1	1	1
(C) Refinement with Phenix				
PHENIX version	1.16_3549	1.16_3549	1.16_3549	1.16_3549
Resolution range [Å]	45.1 – 1.19	35.6 – 1.86	41.9 – 1.70	42.6 – 1.35
Reflections used for R_{free}	6532	1517	2036	4071
Reflections used for R_{work}	124102	28837	38671	77349
Final R values				
R_{free} [%]	13.5	24.8	22.1	15.6
R_{work} [%]	11.9	21.3	18.2	13.5
No. of atoms (non-hydrogen)				
Protein atoms	2998	2675	2698	2757
Water molecules	444	170	215	305
Ligand atoms	16	23	23	33
RMSD from ideality				
Bond angles [°]	1.0	0.9	0.8	1.0
Bond length [Å]	0.006	0.006	0.006	0.007
Ramachandran plot^[b]				
Most favoured regions [%]	96.5	94.6	94.7	96.0
Additionally allowed regions [%]	3.2	5.0	5.0	3.7
Generously allowed regions [%]	0.3	0.3	0.3	0.3
Mean B-factors [Å²]^[c]				
Protein atoms	18.3	28.1	25.9	23.4
Water molecules	33.6	33.4	33.5	38.5
Ligand atoms	13.3	24.8	21.7	18.9

TGT _{WT/SFW} ^{space group} • Chapter.Ligand PDB ID	TGT _{SFW} ^{C2} • 2.4 6YHE	TGT _{WT} ^{P2} • 2.5 6YIQ	TGT _{SFW} ^{C2} • 2.5 6YH3	TGT _{WT} ^{C2} • 2.6 6YGS
(A) Data collection and processing				
Collection site	BESSY 14.1	BESSY 14.1	BESSY 14.1	BESSY 14.1
No. crystals used	1	1	1	1
Wavelength λ [Å]	0.91841	0.91841	0.91841	0.91841
Space group	C2	P2	C2	C2
Unit cell parameters				
a [Å]	84.7	71.0	84.9	85.0
b [Å]	64.8	64.9	65.2	64.8
c [Å]	71.8	87.5	71.6	71.5
β [°]	94.0	95.0	94.2	93.9
(B) Diffraction data				
Resolution range [Å]	42.63 – 1.54 (1.64 – 1.54)	47.80 – 1.58 (1.67 – 1.58)	42.78 – 1.49 (1.58 – 1.49)	42.58 – 1.40 (1.49 – 1.40)
Unique reflections	55575 8659	105640 16991	61848 9665	69560 10987
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	4.4 (42.0)	4.9 (49.4)	3.9 (51.7)	6.2 (49.8)
Completeness [%]	97.6 (94.7)	96.8 (97.1)	97.4 (94.8)	91.9 (90.2)
Redundancy	3.1 (3.1)	3.3 (3.4)	3.9 (3.7)	4.1 (4.1)
$I/\sigma(I)$	11.9 (2.0)	13.2 (2.1)	17.2 (2.4)	11.8 (2.3)
Wilson B-factor [Å ²]	22.1	18.5	19.7	15.7
Matthews Coefficient [Å ³ ·Da ⁻¹] ^[a]	2.3	2.3	2.3	2.3
Solvent content [%] ^[a]	46.1	47.3	46.4	46.2
Molecules in asymmetric unit	1	2	1	1
(C) Refinement with Phenix				
PHENIX version	1.16_3549	1.16_3549	1.16_3549	1.16_3549
Resolution range [Å]	42.6 – 1.54	47.8 – 1.58	42.8 – 1.49	42.4 – 1.40
Reflections used for R_{free}	2779	5282	3093	3478
Reflections used for R_{work}	52796	100354	58755	66082
Final R values				
R_{free} [%]	18.2	20.2	16.5	16.4
R_{work} [%]	14.8	16.0	13.4	13.5
No. of atoms (non-hydrogen)				
Protein atoms	2771	10788	2776	2777
Water molecules	241	538	300	308
Ligand atoms	30	50	43	58
RMSD from ideality				
Bond angles [°]	1.0	0.9	0.9	0.9
Bond length [Å]	0.008	0.008	0.007	0.008
Ramachandran plot^[b]				
Most favoured regions [%]	94.7	94.4	95.7	94.6
Additionally allowed regions [%]	4.9	5.2	4.0	5.1
Generously allowed regions [%]	0.3	0.3	0.3	0.3
Mean B-factors [Å²]^[c]				
Protein atoms	30.4	25.4	26.6	21.0
Water molecules	37.8	34.0	39.5	36.3
Ligand atoms	33.0	20.8	22.3	15.4

TGT _{WT/5FW} ^{space group} • Chapter.Ligand	TGT _{5FW} ^{C2} • 2.6	TGT _{5FW} ^{C2} • 2.7	TGT _{5FW} ^{C2} • 2.8
PDB ID	6YH1	6YHD	6YYZ
(A) Data collection and processing			
Collection site	BESSY 14.1	BESSY 14.1	BESSY 14.1
No. crystals used	1	1	1
Wavelength λ [Å]	0.91841	0.91841	0.91841
Space group	C2	C2	C2
Unit cell parameters			
a [Å]	85.9	90.6	83.7
b [Å]	65.3	65.4	65.0
c [Å]	72.0	70.6	71.6
β [°]	94.0	96.1	93.7
(B) Diffraction data			
Resolution range [Å]	42.96 – 1.55 (1.65 – 1.55)	45.03 – 1.25 (1.33 – 1.25)	42.48 – 1.21 (1.28 – 1.21)
Unique reflections	55401 8137	112098 17917	114591 17987
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	6.1 (35.9)	3.7 (49.6)	3.8 (47.6)
Completeness [%]	96.9 (88.3)	99.4 (98.5)	98.1 (95.7)
Redundancy	3.7 (3.5)	3.8 (3.8)	3.4 (3.2)
$I/\sigma(I)$	11.7 (2.5)	15.8 (2.1)	14.2 (2.1)
Wilson B-factor [Å ²]	18.6	15.1	15.1
Matthews Coefficient [Å ³ ·Da ⁻¹] ^[a]	2.3	2.4	2.3
Solvent content [%] ^[a]	47.4	49.0	45.5
Molecules in asymmetric unit	1	1	1
(C) Refinement with Phenix			
PHENIX version	1.16_3549	1.16_3549	1.16_3549
Resolution range [Å]	43.0 – 1.55	45.0 – 1.25	37.1 – 1.21
Reflections used for R_{free}	2770	5605	5730
Reflections used for R_{work}	52630	106493	108860
Final R values			
R_{free} [%]	16.7	14.4	15.9
R_{work} [%]	13.3	12.1	13.4
No. of atoms (non-hydrogen)			
Protein atoms	2868	3035	2889
Water molecules	316	414	369
Ligand atoms	58	28	30
RMSD from ideality			
Bond angles [°]	1.0	1.0	1.0
Bond length [Å]	0.009	0.007	0.007
Ramachandran plot^[b]			
Most favoured regions [%]	94.7	95.0	93.8
Additionally allowed regions [%]	5.0	4.7	5.8
Generously allowed regions [%]	0.3	0.3	0.3
Mean B-factors [Å²]^[c]			
Protein atoms	24.5	20.0	22.7
Water molecules	38.4	34.0	35.9
Ligand atoms	18.0	16.0	15.5

Die Schale mit der höchsten Auflösung wird durch Werte in Klammern beschrieben.^[a] Matthews coefficient und solvent content wurden mit dem Programm *Matthews_coef* aus der CCP4-Reihe (8.4) berechnet.^[81]

^[b]Ramachandran-Plots wurden mit *PROCHECK*^[85] und ^[c]mittlere B-Faktoren wurden mit *MOLEMAN*^[86] berechnet.

3

Kapitel 3

Biophysikalische Analyse der lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche über die Adressierung mit Monosaccharid-basierten *lin*-Benzoguanin-Liganden

Sugar Acetonides are a Superior Motif for Addressing the Large, Solvent-Exposed Ribose-33 Pocket of tRNA-Guanine Transglycosylase

L. D. MOVSISYAN^{1*}, E. SCHÄFER^{1*}, A. NGUYEN², F. R. EHRLMANN², A. SCHWAB¹, T. ROSSOLINI¹, D. ZIMMERLI³, B. WAGNER³, H. DAFF³, A. HEINE², G. KLEBE², F. DIEDERICH¹

*Diese Autoren haben im gleichen Maße beigetragen

¹Laboratorium für Organische Chemie, ETH Zürich, Vladimir-Prelog-Weg 3, HCI, 8093 Zürich, Schweiz

²Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg, Marbacher Weg 6–10, D-35037 Marburg, Deutschland

³Roche Ltd, Discovery Technologies, Gebäude 92, 4070 Basel, Schweiz

3.1 Vorwort

Dieses Projekt wurde in Kooperation mit DR. ELISABETH SCHÄFER (Arbeitsgruppe PROF. DR. FRANÇOIS DIEDERICH, ETH Zürich, Schweiz) und DR. FREDERIK R. EHLMANN (Arbeitsgruppe PROF. DR. GERHARD KLEBE, Philipps-Universität Marburg, Deutschland) ausgearbeitet. DR. ELISABETH SCHÄFER führte die Synthese, sowie die Reinigung der Liganden durch. Die Proteinreinigung, biophysikalische Analyse der thermodynamischen Profile, sowie die röntgenkristallographischen Untersuchungen wurden von DR. FREDERIK R. EHLMANN und vom Autor dieser Arbeit durchgeführt. Weitere biophysikalische Bestimmungen von $\log D$ und der mikrosomalen Stabilität wurden von HAMINA DAFF und BJÖRN WAGNER (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Schweiz) durchgeführt. Die initiale Version der Publikation wurde von DR. LEVON MOVSISYAN (Arbeitsgruppe PROF. DR. FRANÇOIS DIEDERICH, ETH Zürich, Schweiz) verfasst.

3.2 Kurzfassung

Neuartige zuckerfunktionalisierte *lin*-Benzoguanine wurden entworfen und synthetisiert, um die Ribose-33-Tasche der tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT) aus *Zymomonas mobilis* zu adressieren. Mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) und Röntgenstrukturanalyse wurde die Ligandenbindung analysiert und durch Variation der Größe und Anzahl der Schutzgruppen am Zucker die Taschenbelegung optimiert. Die Anwesenheit eines polyzyklischen Wasserclusters konnte durch die Erkennung am Zuckeranteil des Liganden nachgewiesen werden. Die hierbei verwendeten Acetonid-geschützten Ribo- und Psicofuranosyl-Derivate wurden als hochpotente Struktur motive identifiziert, die von struktureller Steifigkeit, guter Löslichkeit und metabolischer Stabilität profitieren. Daher besitzen Zucker-Acetonide einen bedeutenden, aber noch nicht allgemein gewürdigten Stellenwert im Wirkstoffdesign.

3.3 Einleitung

Seit vielen Jahren wird die TGT aus *Zymomonas mobilis* aufgrund ihrer Neigung zur Bildung sehr guter Kristalle als Ersatz für die TGT aus *Shigella spp.* verwendet. Die Bindungsstelle des Enzyms ist bei diesen Bakterien hochkonserviert und besteht aus einer zentralen Guanin/preQ₁-34-Austauschtasche angrenzend zur Ribose-33/Uracil-33-, sowie Ribose-34/Phosphat-34-Bindungstasche.^[33] Aus vergangenem strukturbasierten Design wurde das trizyklische 6-Aminoimidazo[4,5-*g*]chinazolin-8(7H)-one (*lin*-Benzoguanin) als bevorzugtes Grundgerüst zur Besetzung der Nukleobasen-Austauschtasche identifiziert.^[87]

Die *lin*-Benzoguanine können an C(2'), C(4') oder an beiden Positionen substituiert werden (Abb. 3.1/3.2). Eine Substitution an C(4') erlaubt es, die tiefe Ribose-34/Phosphat-34-Tasche zu füllen und sich weiter in Richtung der TGT-Homodimer-Grenzfläche auszudehnen. In einer vergangenen Publikation wurde die Tasche mit *Spiking*-Liganden adressiert und moduliert.^[40]

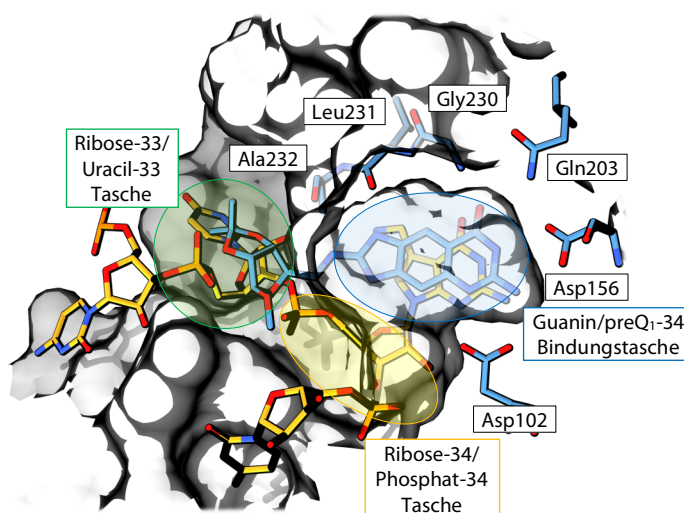


Abbildung 3.1 Aktives Zentrum von *Z. mobilis* TGT mit preQ₁-tRNA-Substrat (C_{gelb}, 3.20 Å Auflösung, PDB Code: 1Q25)^[33] ausgerichtet auf den neuartigen Liganden **3.2** (C_{blau}, 1.17 Å Auflösung, PDB Code: 5JSV). Die Proteinoberfläche ist in grau dargestellt. Die aktive Bindungstasche ist in drei Bereiche unterteilt, wobei die Hauptbindungsstelle die Guanin/preQ₁-Bindungstasche (blau markiert) ist, die von den Seitentaschen Ribose-33/Uracil-33 (grün markiert) und Ribose-34/Phosphat-34 (gelb markiert) begrenzt werden. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau.

Die Ribose-33-Tasche ist eine weitflächige Schale mit wasserexponierten polaren und unpolaren Aminosäurereste zur Erkennung des Ribose-Zuckers am tRNA-Substrat.^[33] Zuvor eingeführte hydrophobe und hydrophile Substituenten an Position C(2') des *lin*-Benzoguanin-Grundgerüsts besetzen die Ribose-33-Tasche und zeigen in den meisten Fällen einen hohen Grad an konformativer Flexibilität, die durch Kokristallstrukturanalyse und MD-Simulationen nachgewiesen wurde.^[71,88–91] Selbst nach Entwicklung von Liganden mit einstelliger nanomolarer Aktivität konnte keine optimale Belegung der flachen Ribose-33-Tasche erreicht werden, selbst wenn sich die C(2')-Substituenten bis in die Ribose-32-Untertasche aus-

dehnten.^[91] Daher wurde die Ausarbeitung neuer funktionale Substituenten an Position C(2') des *lin*-Benzoguanin-Grundgerüsts zur besseren Belegung der Ribose-33-Tasche verfolgt, die bessere Potenz und physikalisch-chemische Eigenschaften aufweisen.

Durch C(4')-Furanosid Funktionalisierungen am *lin*-Benzoguanin konnten bessere Wasserlöslichkeiten erreicht werden, obwohl hierdurch Bindungsaffinitäten (217 – 353 nM) eingebüßt wurden.^[57,92] Erfolgreich bestimmte Kokristallstrukturen zeigen, dass die Abnahme der Affinität auf eine ungünstige Verdrängung eines Wasserclusters zurückzuführen ist. Dieser besteht aus einem fünfgliedrigen Wasserring, welcher ursprünglich die katalytischen Seitenketten Asp102 und Asp280 in der Ribose-34-Tasche solvatisiert. Basierend auf Kristallstrukturanalysen von Ether-geschützten Hydroxygruppen am Furanosid konnten hydrophobe Regionen dieser Tasche adressiert werden, wodurch sich die Affinität erhöhte.

Diese Erkenntnisse dienen als Grundlage dieser Studie um die Bindung von *lin*-Benzoguanin-Liganden mit Acetonid-geschützten Furanose und Pyranose-Substituten am C(2') zur Ribose-33-Tasche in der TGT genauer zu charakterisieren (Abbildung 3.2). Dieses Acetonid-Acetal-Motiv hat eine hohe Prävalenz in zugelassenen Medikamenten und kombiniert metabolische Stabilität mit einzigartigen raumfüllenden und physikochemischen Eigenschaften.

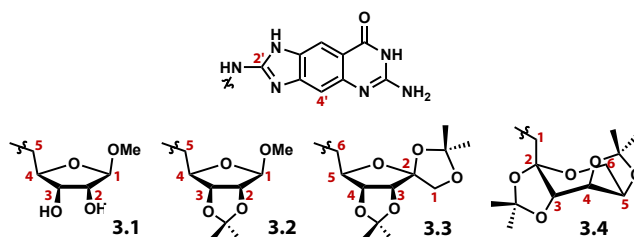


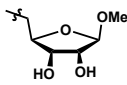
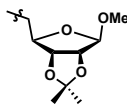
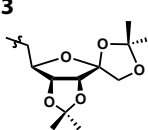
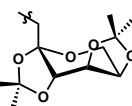
Abbildung 3.2 Strukturen der Liganden **3.1** – **3.4** zur Adressierung der Ribose-33-Tasche.

Die Anwendung des erweiterten Konzepts zum Bioisosterismus, gepaart mit dem Acetonid-Motiv zur Untersuchung der Ribose-33-Tasche resultiert hierbei in einer Reihe von Kohlenhydraten die von Furanosiden zu Pyranosiden übergehen. Ribose **3.1** ahmt hierbei die Ribose des natürlichen tRNA-Substrats nach. Erweiterung bis hin zum Pyranosid (**3.4**) mit Anreicherung der Furanoside mit einer oder zwei Acetonidgruppen (**3.2** und **3.3**) sorgen hierbei für zunehmende Raumfüllung in der flachen Ribose-33-Tasche.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Bindungsaktivität und physikochemische Eigenschaften

Tabelle 3.1 TGT Bindungsaffinitäten und thermodynamische Profile der Liganden **3.1** – **3.4**. Die K_d -, $\text{clog}D_{7.4}$ -, $\text{clog}P$ - und gemessenen $\log D$ -Werte der Liganden **3.1** – **3.4** werden gezeigt. Um den Effekt überlagerte Protonierungseffekte auf das thermodynamische Profil der Bindung zu berücksichtigen, wurden Direkttitrationen in drei Puffern bei einem pH 7.8 (HEPES, Tricin, TRIS) durchgeführt und $\Delta H^\circ_{\text{ion}}$ bestimmt.

Ligand	K_d [nM]	ΔG° [kJ mol ⁻¹]	Puffer	ΔH° [kJ mol ⁻¹]	$-\text{T}\Delta S^\circ$ [kJ mol ⁻¹]	$\text{clog}D$ ($\log D$)	$\text{clog}P$
3.1 	1120 ± 110	-34.0 ± 0.03	HEPES	-37.5 ± 1.0	3.6 ± 1.7	-1.05	-0.87
			Tricin	-33.4 ± 1.4	-0.6 ± 1.4		
			TRIS	-25.5 ± 0.6	-8.7 ± 1.7		
			Ion. korrigiert	-46.9	12.9		
3.2 	14 ± 7	-45.0 ± 0.7	HEPES	-64.2 ± 1.9	19.6 ± 3.8	0.63	0.72
			Tricin	-53.0 ± 2.3	7.4 ± 3.3		
			TRIS	-42.3 ± 0.4	-2.4 ± 0.9		
			Ion. korrigiert	-79.5	34.5		
3.3 	32 ± 13	-43.0 ± 0.4	HEPES	-55.9 ± 3.2	12.5 ± 1.6	2.52	2.61
			Tricin	-45.5 ± 3.2	2.9 ± 0.3		
			TRIS	-34.6 ± 0.6	-9.9 ± 0.9		
			Ion. korrigiert	-71.1	28.1		
3.4 	321 ± 193	-37.1 ± 1.5	HEPES	-41.7 ± 1.0	3.2 ± 1.0	3.33	3.47
			Tricin	-33.9 ± 0.2	-0.2 ± 0.5		
			TRIS	-17.8 ± 0.6	-18.4 ± 0.9		
			Ion. korrigiert	-60.6	23.6		

Die angezeigten Fehler sind Standardabweichungen aus mindestens drei Messungen. $-\text{T}\Delta S^\circ$ wurde mit der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Formel 3.2) berechnet.

Die Dissoziationskonstanten K_d der Liganden **3.1** – **3.4** wurden mit isothermer Titrationskalorimetrie (ITC, Tabelle 3.1) gemessen.^[71,90] Die hierbei vermessenen Protein-Ligand-Komplexe weisen facettenreiche Struktur-Aktivitäts-Beziehungen vom nanomolaren bis hin zum mikromolaren Bereich auf. Das natürliche Substratmimetikum **3.1** zeigt die niedrigste Potenz ($K_d = 1120$ nM), während sein Acetonid **3.2** ($K_d = 14$ nM) und die strukturerweiterte Form **3.3** ($K_d = 32$ nM) um den Faktor 35 bzw. 80 höhere Aktivitäten aufweisen. Eine geringere Affinitätssteigerung wurde für Pyranosid **3.4** ($K_d = 321$ nM) erzielt. Bereits bekannt ist die Pufferabhängigkeit der vermessenen Wärmesignale bei der Titration von *lin*-Benzoguanin-Liganden. Dies ist auf die Änderung des Protonierungszustands am Stickstoff N(5) des *lin*-Benzoguanin-Grundgerüsts während der Bindung zurückzuführen (Abschnitt 3.8). Für **3.2** – **3.4** werden bei der Bindung 0.8 – 0.9 mol Protonen übertragen. Interessanterweise fällt der

Wert für **3.1** mit 0.45 mol Protonen niedriger aus. Dies deutet an, dass auch die OH-Gruppen am Ribosering eine Änderung im Protinierungszustand durchlaufen.^[57,71]

Zum Vergleich der physikochemischen Eigenschaften von Furanosid- und Pyranosid-Substituenten und um die Auswirkungen der Acetonid-Gruppen zu evaluieren, wurden mit Hilfe der ACD/Labs-Software^[93] $\text{clog}D$ und $\text{clog}P$ berechnet. Die hierbei vermessenen $\log D$ -Werte für **3.2/3.3** unterstützen im gewissen Maß die Genauigkeit der berechneten $\text{clog}D$ - und $\text{clog}P$ -Werte aller Liganden. Es zeigt sich ein zunehmender Trend von $\text{clog}D$ und $\text{clog}P$ mit der steigenden Anzahl von Acetonid-Einheiten in den Liganden als auch mit der Zunahme der Ringgröße. Während Ribose **3.1** das Acetonid-Motiv fehlt und negative Werte liefert ($\text{clog}D = -1.05$, $\text{clog}P = -0.87$), zeigt das analoge Acetonid **3.3** einen erhöhten hydrophoben Charakter. Mit der Einführung einer weiteren Acetonid-Gruppe nimmt der $\text{clog}D$ um einen Faktor von zwei zu (**3.3**, $\text{clog}D = 2.52$, $\log D = 2.04$). Die Erweiterung der Ringgröße vom Fructofuranosid **3.3** zum Fructopyranosid **3.4** macht den Liganden erneut weniger hydrophil und spiegelt sich in den höchsten $\text{clog}D$ - und $\text{clog}P$ -Werten mit 3.33 bzw. 3.47 wider, was angesichts einem Vergleichs der gemessenen Werte für Tetrahydrofuran ($\log D = 0.46$) und Tetrahydropyran ($\log D = 0.82$) nicht unerwartet ist.^[94]

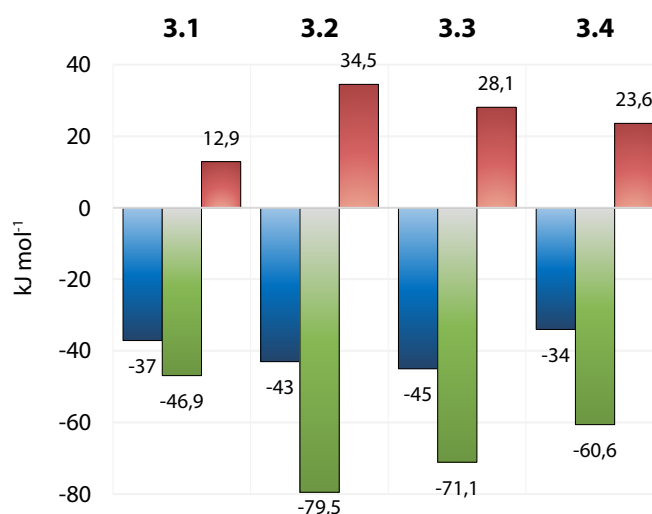


Abbildung 3.3 Thermodynamische Profile der TGT-3.1 bis TGT-3.4 Komplexbildung, die von der ITC erhalten wurden. ΔG° (blau), korrigierte Werte für ΔH° (grün) bzw. $-T\Delta S^\circ$ (rot) werden in kJ mol⁻¹ dargestellt.

Hinsichtlich der thermodynamischen Profile von **3.1** – **3.4**, ist die Proteinkomplexbildung zwischen Protein und Ligand enthalpisch getrieben (Abbildung 3.3).^[95–97] Insbesondere für **3.2/3.3** ($\Delta H^\circ = -79.5$ und $\Delta H^\circ = -71.1$ kJ mol⁻¹) können erhöhte enthalpische Beiträge während des Bindungsprozesses beobachtet werden, verglichen mit **3.1** mit den geringsten Beitrag ($\Delta H^\circ = -46.9$ kJ mol⁻¹) innerhalb dieser Reihe von kohlenhydratsubstituierten Inhibi-

toren. Dies könnte durch die hydrophile Natur der Ribose **3.1** und ihre Wirkung auf die umgebenden Wassermoleküle in der großen lösungsmittlexponierten Bindungsstelle erklärt werden. Im Allgemeinen werden beträchtliche Schwankungen der freien Gibbs-Energie zwischen **3.2/3.3** und **3.1/3.4** ($\Delta\Delta G^\circ = 9.4 \text{ kJ mol}^{-1}$) beobachtet. Da es sich bei der Ribose-33-Tasche um eine große lösungsmittlexponierte Bindungsstelle handelt, veranschaulichen diese Ergebnisse den Unterschied in der Wirkung auf die Enthalpie-Entropie-Kompensation im Vergleich zu Beobachtungen an schmalen Bindungsstellen, bei denen eine stringente Korrelation gegeben ist. Insgesamt befinden sich die Liganden **3.2/3.3** in einem ähnlichen Affinitätsbereich wie bereits charakterisierte *lin*-Benzoguanine, die auf die Ribose-33-Tasche abzielen.^[90] Vermutlich führen starke Solvatisierungseffekte zu kostspieligen energetischen Strafen, was sich in der reduzierten Affinität widerspiegelt.

Darüber hinaus wurde die metabolische Stabilität (intrinsische Clearance, Cl_{int}) der Acetonide **3.2**, **3.3** und **3.4** in einem mikrosomalen Stabilitätsassay mit humanen-, Maus- und Rattenmikrosomen bestimmt. Alle drei Liganden zeigen dabei eine geringe Clearance und versprechen daher eine lange Verweildauer auf dem Protein ($<10 \text{ mL min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).^[98]

3.4.2 Kristallstrukturanalyse

Im Rahmen der Arbeit war es möglich die Röntgenstrukturen aller vier Liganden hochaufgelöst (zwischen 1.17 und 1.36 Å) in Komplex mit *Z. mobilis* TGT zu erhalten. Innerhalb der Guanin/preQ₁ Bindetasche ist die *lin*-Benzoguanin-Grundstruktur wieder zu finden. In Komplexen **3.1** – **3.4** wird das Grundgerüst zwischen den Seitenketten Met260 und Tyr106 eingebettet (nicht dargestellt), wodurch π - π -Wechselwirkungen zwischen der aromatischen

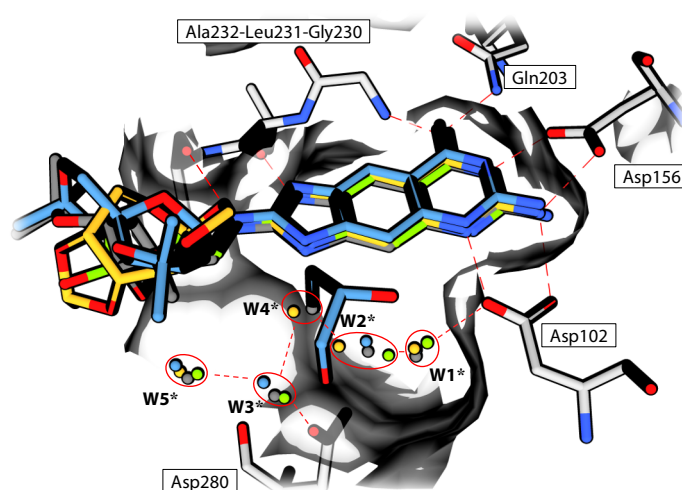


Abbildung 3.4 Vergleich der Wassermoleküle W1*–W5* der Ribose-34-Tasche. Die Wassermoleküle werden als Kugeln dargestellt und entsprechend den Liganden (**3.1** Grün, **3.2** Grau, **3.3** Blau, **3.4** Gelb) dargestellt. Die Proteinseitenketten, angedeutet Oberfläche werden in grau und Wasserstoffbrückenbindungen als rote gestrichelte Linien abgebildet. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau.

Aminosäure und dem *lin*-Benzoguanin auftreten. Im Weiteren werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem *lin*-Benzoguanin und den Seitenketten Asp102, Asp156, Gln203, dem Rückgrat NH von Gly230 und den Rückgrat-Carbonylgruppen von Leu231 und Ala232 ausgebildet, die ein typisches Muster für gebundene *lin*-Benzoguanin-Liganden darstellen (Abbildung 3.4).^[2-4,18]

Die polare Ribose-34-Tasche wird hierbei durch ein konserviertes Wassercluster, bestehend aus fünf Wassermolekülen (W1* – W5*), solvatisiert. Innerhalb des Wassernetzwerkes verbinden W1* und W2* durch Wasserstoffbrückenbindungen die Seitenketten Asp102 und Asp280 miteinander. Asp280 interagiert des Weiteren mit W3*, welches durch eine weitere Wasserstoffbrücke mit W4* mit dem Imidazol-Stickstoff N(3') des Liganden in Kontakt tritt. Zusätzlich kann eine Interaktion zwischen W3* und W5* beobachtet werden. Im Fall von Ligand **3.3** wird W4* durch ein Glycerolmolekül aus dem Cryo-Puffer ersetzt, das als Surrogat für drei Wassermoleküle betrachtet werden kann und voraussichtlich keinen Einfluss auf den Bindungsmodus der Liganden in der Ribose-33-Tasche hat.^[101]

Zunächst wird der **TGT-3.1** Komplex betrachtet, der das natürliche Ribosesubstrat als diffuse Elektronendichte andeutet, die eine eindeutige Zuweisung des Zuckerrestes nicht zulässt (Abbildung 3.5). Hier wird davon ausgegangen, dass der Zuckerrest aufgrund der zusätzlichen Elektronendichte, sowie erhöhten *B*-Werten eine hohe Restmobilität innerhalb der Ribose-33-

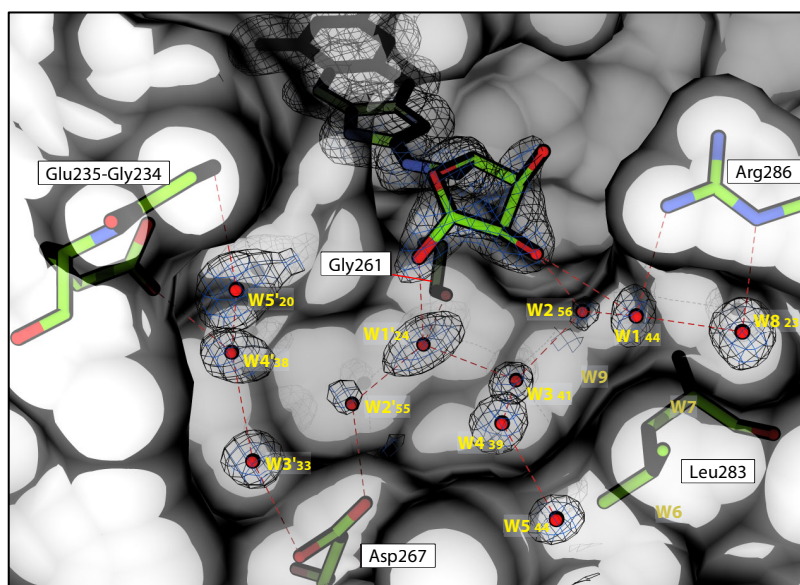


Abbildung 3.5 Bindungsmodus von **3.1** ($C_{\text{grün}}$, 1.36 Å Auflösung, PDB Code: 6FMN) in der aktiven Tasche von *Z. mobilis*. $2mF_o - DF_c$ ist um den Liganden und ausgewählten Wassermolekülen dargestellt (blau, Konturstufe 1.0 σ). *B*-Werte (\AA^2) der Wassermoleküle sind in gelb durch die Zahlenwerte dargestellt. Die Proteinoberfläche ist hellgrau wiedergegeben, Wasserstoffbrückenbindungen sind als rote gestrichelte Linien abgebildet. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau. Fehlende Wassermoleküle im [5+5+4]-Cluster werden durch dunkelgelbe Schrift angedeutet. Die Beschreibung des Clusters folgt in folgenden Strukturen.

Tasche aufweist. Die Strukturanalyse beschränkt sich dadurch auf die höchst populierte Konformation des Zuckersrests, schließt jedoch nicht aus, dass mehr Konformationen zur beobachteten Elektronendichte beitragen können. Der durchschnittliche *B*-Wert des Ribofuranosylrestes (33 \AA^2) zeigt einen signifikant höheren *B*-Wert gegenüber des *lin*-Benzoguanin-Kerns (10 \AA^2). Der Ribofuranosylrest nimmt dabei eine 1E -Briefumschlag-Konformation an, wodurch sich die C(4)—C(5) Bindung in der *trans-gauche*-Konformation (*tg*) anordnet und die OMe-Gruppe sich zur Ribose-33-Tasche orientiert.^[102] Die zugehörige OMe-Methylgruppe wird dabei in der Elektronendichtekarte nicht aufgelöst.

Innerhalb der Ribose-33-Tasche werden zwei Wassernetzwerke beobachtet. Die Aminosäuren Gly234, Glu235, Gly261 und Asp267 auf der linken Seite werden durch eine fünfgliedrige, kettenartige Wasserstruktur (W1' – W5') solvatisiert. Die Wassermoleküle W2', W3' und W4' solvatisieren die Carboxylat-Gruppen von Asp267 bzw. Glu235, während Wassermolekül W5' an den Wasserstoffbindungen mit den NH-Gruppen des Rückgrats der verzerrten Gly234/Gly236-Schleife beteiligt ist. Weiterhin befindet sich rechts eine weitere kettenartige Struktur, bestehend aus sechs Wassermolekülen, die die Seitenketten Arg286, Cys281 und Gln292 (nicht dargestellt) solvatisieren. Beide Wassernetzwerke werden durch W1' und W3 miteinander verbunden und bilden die erste Solvatisierungsschicht. W1' tritt darüber hinaus mit Gly261 in Kontakt. So wird die C(2) Hydroxylgruppe von den Wassermolekülen W1 und W2 solvatisiert, während der Sauerstoff der OMe-Gruppe mit W1' eine Interaktion eingeht.

Die Kristallstruktur von TGT im Komplex mit **3.2** besitzt eine gut definierte Elektronendichte um den Ribosidrest (Abbildung 3.6). Der durchschnittliche *B*-Wert des Zuckerrests (22 \AA^2) nimmt den zweifachen Wert gegenüber dem des *lin*-Benzoguanin-Kerns ein (11 \AA^2) und spricht für eine niedrigere Restmobilität in der Ribose-33-Tasche im Vergleich zu **3.1**. Der Ribofuranosid-Ring nimmt eine E_O -Briefumschlag-Form an und besitzt eine bevorzugte *tg* Konformation zwischen C(4)—C(5), wodurch die MeO-Gruppe zur Ribose-34-Tasche ragt. Gegenüberliegend zur Methoxygruppe besetzt der Acetonid-Anteil die Ribose-33-Tasche und das Ribose O_{Ring} Atom wird durch W5* hydratisiert, welches Bestandteil des Wasserclusters innerhalb der Ribose-34-Tasche ist. Der 5-gliedrige kettenartige Cluster auf der linken Seite der Tasche bleibt im Vergleich zum TGT-Komplex mit **3.1**, der Asp267, Gly234, Glu235, Gly236 und Gly261 solvatisiert, im Wesentlichen gleich. Im Gegensatz zur vorherigen Struktur kann statt den sechs Wassermolekülen auf der rechten Seite ein Gebilde aus neun Wassermolekülen beobachtet werden, die einen trizyklischen Cluster mit zwei fünf- und einem viergliedrigen Ring ([5+5+4]-Cluster) bilden. Zusätzlich zu der zuvor in **3.1** beschriebenen Kettenstruktur komplettieren drei weitere Wassermoleküle den beschriebenen Cluster (W1 – W9). Aus der Literatur ist bekannt, dass in einem Fünfeck angeordnete Wasserstrukturen energetisch günstig positioniert sind.^[103–106] Dieses Wassernetzwerk umhüllt die Leu283 Seitenkette und stellt

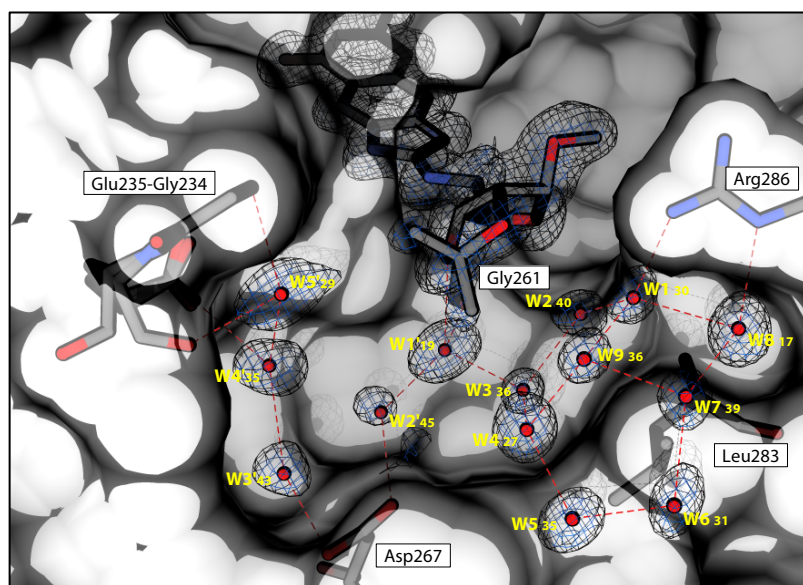


Abbildung 3.6 Bindungsmodus von **3.2** (C_{grau} , 1.17 Å Auflösung, PDB Code: 5JSV) in der aktiven Tasche von *Z. mobilis*. $2mF_o - DF_c$ ist um den Liganden und ausgewählten Wassermolekülen dargestellt (blau, Konturstufe 1.0 σ). B -Werte (Å²) der Wassermoleküle sind in gelb durch die Zahlenwerte dargestellt. Die Protein-oberfläche ist hellgrau wiedergegeben, Wasserstoffbrückenbindungen sind als rote gestrichelte Linien abgebildet. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau.

hierdurch Van-der-Waals Kontakte (vdW, 3.6 – 5.0 Å) zum Isobutyl-Rest her. Zugewandt zur Acetonid-Gruppe des Zuckerrests befindet sich ein Fünfeck vom Wassercluster im Van-der-Waals-Abstand (3.6 – 4.7 Å). Zusätzliche Stabilisation erfährt der [5+5+4]-Cluster durch Wasserstoffbrückenbindungen zu den Seitenketten von Arg286, Cys281 und Gln292, sowie durch Vernetzung mit der ersten Solvatisierungsschicht, die mit dem umgebenden Wasserphase verbunden ist. Ebenfalls wird der [5+5+4]-Cluster durch W1' zur benachbarten Wasserstruktur vernetzt (W1' – W5') und führt an gleicher Stelle zu Wechselwirkungen mit dem Sauerstoffatom am Acetonid des Liganden.

Die Kristallstruktur der TGT mit **3.3** im Komplex zeigt auch eine definierte Elektronendichte des Liganden (Abbildung 3.7). Ebenfalls befindet sich der Psicofuranose-Ring in der E_o -Briefumschlag-Form, worin sich die Bindung zwischen C(5)—C(6) mit der *tg* Konformation einstellt. Der 1,2-Acetonid-Anteil zeigt in Richtung der Tasche von Ribose-33, während das 3,4-Acetonid bis zum Rand der Tasche von Ribose-34 reicht. Ähnlich zu den vorherigen Komplexen **3.1** und **3.2** weist das *lin*-Benzoguanin-Grundgerüst einen durchschnittlichen B -Wert um 12 Å auf. Der Psicofuranose-Substituent hat dagegen einen etwa dreifach höheren durchschnittlichen B -Wert (35 Å), der mit dem durchschnittlichen B -Wert der Ribose-Einheit im **TGT-3.1** Komplex vergleichbar ist. Durch die 1,2-Acetonid-Gruppe werden Van-der-Waals-Abstände in der Ribose-33-Tasche hergestellt, worin zwei Wassernetzwerke in der Elektronendichtekarte aufgelöst werden. Der trizyklische [5+5+4]-Cluster besitzt die gleiche

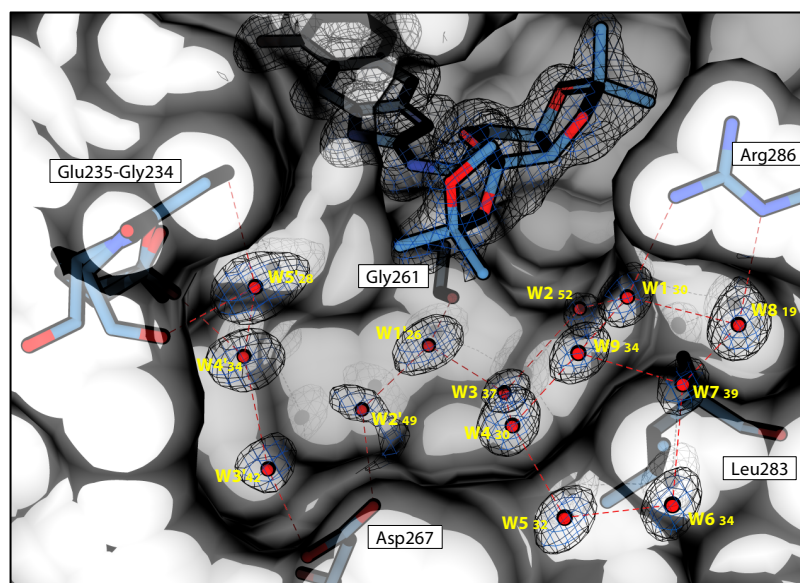


Abbildung 3.7 Bindungsmodus von **3.3** (C_{blau} , 1.22 Å Auflösung, PDB Code: 5JSW) in der aktiven Tasche von *Z. mobilis*. $2mF_o - DF_c$ ist um den Liganden und ausgewählten Wassermolekülen dargestellt (blau, Konturstufe 1.0 σ). B -Werte (\AA^2) der Wassermoleküle sind in gelb durch die Zahlenwerte dargestellt. Die Protein-oberfläche ist hellgrau wiedergegeben, Wasserstoffbrückenbindungen sind als rote gestrichelte Linien abgebildet. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau.

Anordnung wie im **TGT·3.2** Komplex. Dieser Cluster bildet eine Wasserhülle zwischen der hydrophoben Seitenkette von Leu283 (vdW Abstände = 3.5 – 4.0 Å) und einer Methylgruppe des 1,2-Acetonidrestes (vdW Abstand = 3.4 – 4.3 Å). Zusätzlich solvatisiert der Cluster die Seitenketten von Arg286, Cys281 und Gln292 und nimmt Kontakt mit dem Wasser W5* der Ribose-34-Tasche und dem Wasser W1' des kettenartigen Clusters von der anderen Seite der Ribose-33-Tasche auf. Weitere Wasserstoffbrücken-bindende Wechselwirkungen treten mit der äußeren Lösungsmittelhülle des Proteins auf. Im Gegensatz zu den **TGT·3.1**- und **TGT·3.2**-Komplexen interagiert der Zuckerrest von Ligand **3.3** mit keinem der beiden Wassernetzwerken in der Ribose-33-Tasche.

Die Kristallstruktur von TGT im Komplex mit **3.4** beinhaltet den Fructopyranose Ring in einer abgeflachten 2C_5 Sesselkonformation, worin sich die C(1)—N Bindung synclinal zur C(2)—O_{Ring} Bindung orientiert. Vergleichbar verhält sich der durchschnittliche B -Wert für den *lin*-Benzoguanin-Kern (14 Å) und Pyranosylrest (34 Å) zu dem der Protein-Ligand Komplexe **3.1** und **3.3**. Obwohl nur eine von vier Acetonid-Methylgruppen in der Elektronendichtekarte aufgelöst ist, zeigt die Rekonstruktion des 2,3-Acetonids eine signifikante sterische Abstoßung mit der Tyr106 Seitenkette. Tyr106 minimiert diese Abstoßung, indem es den phenolischen Ring um 90° dreht und neue kurze CH... π (*edge-to-face*, Abbildung 3.8a) Kontakte (3.4 – 4.0 Å) mit dem *lin*-Benzoguanin-Kern bildet.

Auffällige Unterschiede werden im Solvationsmuster der Ribose-33-Tasche im Komplex von **3.4** im Vergleich zu den restlichen Liganden beobachtet. Eine Rekonstruktion des 4,5-Acetonidrest in der unvollständig erkennbaren Elektronendichte lässt vermuten, dass eine seiner Methylgruppen Van-der-Waals-Kontakte ($3.4 - 4.1 \text{ \AA}$) zur Seitenkette von Leu283 ausbildet, welches in zwei gleich besetzten Konformationen vorliegt. Diese Dispersionswechselwirkung zwischen der Methylgruppe und der Seitenkette von Leu283 lässt nicht genügend Raum für die Solvatisierung durch einen trizyklischen $[5+5+4]$ -Wassercluster, wodurch ein solches Cluster

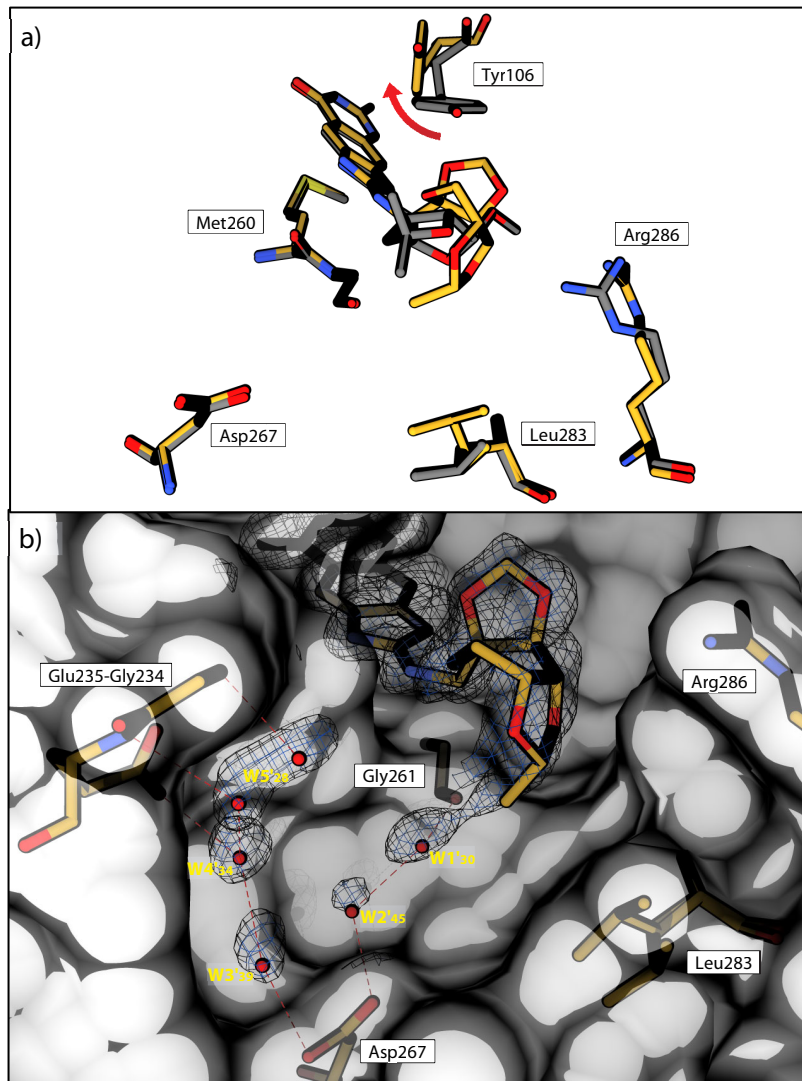


Abbildung 3.8 a) Vergleich der aktiven Tasche in *Z. mobilis* TGT mit Ligand **3.2** (C_{grau} , 1.17 \AA Auflösung, PDB Code: 5JSV) und **3.4** (C_{gelb} , 1.36 \AA Auflösung, PDB Code: 6FPU). b) Bindungsmodus von **3.4** (C_{gelb} , 1.36 \AA Auflösung, PDB Code: 6FPU) in der aktiven Tasche von *Z. mobilis*. $2mF_o - DF_c$ ist um den Liganden und ausgewählten Wassermolekülen dargestellt (blau, Konturstufe 1.0σ). B -Werte (\AA^2) der Wassermoleküle sind in gelb durch die Zahlenwerte wiedergegeben. Die Proteinoberfläche ist hellgrau dargestellt, Wasserstoffbrückenbindungen sind als rote gestrichelte Linien abgebildet. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau.

vollständig aus der Struktur verschwindet (Abbildung 3.8b). Die Wassermoleküle der zweiten kettenartigen Wasserstruktur werden in der Ribose-33-Tasche wiedergefunden. W1' – W4' nehmen die gleichen Positionen ein, wie sie zuvor beschrieben wurden. Hingegen nimmt W5' eine ungeordnete Verteilung an zwei Positionen ein.

3.4.3 Struktur-Aktivitätsbeziehung

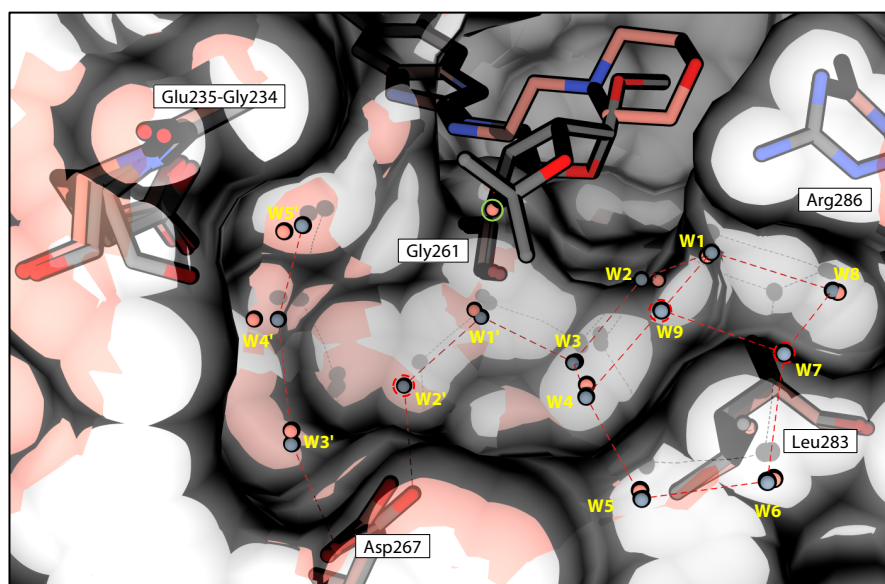
Hochauflöste Kristallstrukturen erlauben es, die thermodynamischen Parameter mit den durch die Kristallographie aufgedeckten Strukturmerkmalen zu korrelieren. In allen vier Kristallstrukturen besetzen die Kohlenhydrat-Substituenten an Position C(2') des *lin*-Benzoguanin-Kerns nur eine einzige (**TGT·3.2**, **TGT·3.3** und **TGT·3.4**) bzw. eine dominierende (**TGT·3.1**) Konformation in der Ribose-33-Tasche ein. Dies war nicht der Fall bei zuvor entwickelten Liganden, die an Position C(2') mit aromatischen Ringen oder flacheren Heteroalicyclen (wie Morpholinringen) funktionalisiert sind, die eine sehr hohe Restmobilität in der Tasche aufweisen, was sich in erhöhten *B*-Werten ausdrückt.^[71,88–91] Daher spiegeln die Bindungsmodi von **3.1** – **3.4** überlegene raumfüllende Eigenschaften wider, insbesondere die Acetonid-geschützten Zucker, die von ihrer einzigartigen Positionierung mit geringer Mobilität in der Ribose-33-Tasche profitieren. Gewöhnlich erfährt ein Ligand in vergrabenen Bindungstaschen bedeutende Beiträge zur Bindungsaffinität. Im Fall der Acetonid-geschützten Zuckerderivate, die die flache, lösungsmittel-exponierte Ribose-33-Tasche mit am C(2') gebundenen Substituenten adressieren, wurden jedoch auch dort signifikante Affinitätssteigerungen beobachtet.

Eine allgemeine Betrachtung der Ligandenreihe verweist auf die Bedeutung der räumlichen Begrenzung im Wirkstoffdesign. Einerseits deuten die diffuse Elektronendichte und die hohen *B*-Werte für den 2,3-ungeschützten Ribosylanteil in **TGT·3.1** darauf hin, dass dieser kleinere Zucker nur eine suboptimale Besetzung der Tasche zulässt. Auf der anderen Seite füllt der Bis-Acetonid-geschützte Fructopyranosyl-Anteil **3.4** die Tasche über ihre Grenzen hinaus aus und provoziert so strukturelle Veränderungen in der Guanin-Bindungsstelle des Enzyms (Verschiebung von Tyr106), um eine strukturelle Anpassung der Ligand-Protein-Bindung zu ermöglichen. Daher werden mit **3.4** die Obergrenze für die Raumfüllung der Ribose-33-Tasche erreicht.

Zur quantitativen Beschreibung der Taschenbelegung, wurden für die Komplexe die lösungsmittelzugänglichen Oberflächenbereiche (SASA) mit Hilfe von MOLOC^[107] berechnet. Zu diesem Zweck wurden die in der Elektronendichtekarte nicht aufgelösten Methylgruppen zu den Geometrien der Liganden **3.1**, **3.2** und **3.4** durch Modellierung hinzugefügt. Berechnete SASAs für die Komplexe **TGT·3.1** (535 Å²), **TGT·3.2** (627 Å²), **TGT·3.3** (737 Å²) und **TGT·3.4** (780 Å²) bestätigen die zunehmende Raumfüllung der Liganden. Alle Wassermoleküle des trizyklischen [5+5+4]-Clusters in **TGT·3.1** – **3.3** verschmelzen weder mit der lösungsmittel-

zugänglichen Oberfläche des Liganden noch mit der des Proteins. Dies deutet darauf hin, dass der geordnete [5+5+4]-Wassercluster zwischen den hydrophoben Zucker- und Proteinoberflächen gebildet wird, um die optimale Raumfüllung der 33-Taschen zu vervollständigen. Anders verhält sich die Situation im **TGT·3.4** Komplex, wo sich die lösungsmittelzugänglichen Oberflächen von Ligand und Protein an der Stelle verbinden, an der sich der trizyklische Wasser-Cluster in **3.2**, **3.3** und teilweise in **3.1** befindet.

Teilweise ist die Proteinfunktion sowie die molekulare Erkennung bei der Entwicklung von Medikamenten in der medizinischen Chemie an die geordnete Wasserstruktur auf ihren hydrophoben Oberflächen gekoppelt.^[108–113] In einem neueren Beispiel wurde gezeigt, dass kleine Alkylsubstituenten die Struktur und Energetik des an die Oberfläche des Proteins Thermolysin gebundenen Wassers deutlich modulieren können.^[101,114–116] Die hier vorgestellten Komplexe zeigen das Potential ungeladener Zuckermoleküle auf, Wassermoleküle in Form von Clustern in einer flachen und lösungsmittel exponierten Tasche mit gemischtem hydrophoben und hydrophilen Charakter zu stabilisieren. Die [5+5+4] trizyklische und fünfgliedrige kettenartigen Wassercluster in der Tasche von Ribose-33 werden durch W1' verbunden, scheinen aber auch unabhängig voneinander zu existieren. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass die Gesamtverschiebung des [5+5+4] Clusters im **TGT·3.4** Komplex keinen Einfluss auf die Position des Wasserclusters hat. In der Mehrheit der Kristallstrukturen von Liganden, die die Ribose-33-Tasche von *Z. mobilis* TGT adressieren, kann der [5+5+4]-Cluster



vollständig wiedergefunden werden.^[71,88–91] Eine Besonderheit weist die Kristallstruktur mit dem C(2')-Morpholinoethylsubstituent am *lin*-Benzoguanin (PDB Code: 4PUJ, Abbildung 3.9)^[71] auf, dessen Substituent, statt die Ribose-33-Taschen zu besetzen, außerhalb der Tasche in schwacher Wechselwirkung mit Arg286 steht. In dieser Struktur wird der polyzyklische Cluster nur unvollständig beobachtet und könnte durch fehlende Van-der-Waals-Abstände des Liganden und Wechselwirkung mit Arg286 in der Ribose-33-Tasche resultieren. Die Belegung der Tasche verursacht eine Unterbrechung der ersten Solvatisierungsschicht, wodurch eine gerichtete Anordnung des Wasserclusters um Leu283 erleichtert wird.

Die bisher betrachteten Strukturmerkmale in den Kristallstrukturen korrelieren gut mit den gemessenen thermodynamischen Profilen (Abbildung 3.3). Ähnlich wie die bisher untersuchten C(2')-substituierten *lin*-Benzoguanine und *lin*-Benzohypoxanthine verhält sich die zuckersubstituierte Ligandenreihe **3.1** – **3.4** stark exotherm, enthalpiegetrieben und mit einer ausgeprägten Enthalpie/Entropie-Kompensation.^[90] Eine starke Abnahme des Enthalpiebeitrags wird für den **TGT·3.1** Komplex ($\Delta\Delta H_{1\rightarrow2} = 32.6 \text{ kJ mol}^{-1}$) in Vergleich zu **TGT·3.2** beobachtet. Die diffuse Elektronendichte ist eine Folge vieler möglicher Konformationen, die sich aus einer nicht-optimalen Besetzung innerhalb der Bindungstasche ergeben, die für den schwachen Enthalpiebeitrag verantwortlich ist. Weiterhin können zusätzliche Solvatisierungen mit W1, W2 und W1' am Zuckerrest beider Wassernetzwerke die Desolvationsenthalpie des freien Liganden nicht ausgleichen und der günstige Entropieunterschied $-\Delta T\Delta S_{1\rightarrow2} = -21.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ zwischen **TGT·3.1** und **TGT·3.2** kann durch höhere Restmobilität des Liganden **3.1** in der Tasche erklärt werden. Auch der polyzyklische Wassercluster im Komplex **3.1** ist nicht vollständig etabliert, wodurch diese Beiträge das thermodynamische Profil beeinflussen. Die thermodynamischen Größen für die Acetonide **3.2** und **3.3** verhalten sich ähnlich, mit den höchsten enthalpischen Antriebskräften und den ungünstigsten entropischen Bedingungen. Da sich die oben beschriebenen Wassercluster in beiden Kristallstrukturen nahezu identisch verhalten, spiegeln die kleinen Unterschiede in ΔH und $-T\Delta S$ wahrscheinlich eher die besseren Anpassungen oder Wechselwirkungen als Unterschiede in der Solvatisierung wider.

Die Differenz zwischen den Gibbs-Energien der Bindung der beiden Bis-Acetonide **3.3** und **3.4** beträgt $\Delta\Delta G_{3\rightarrow4} = 5.9 \text{ kJ mol}^{-1}$. Möglicher Grund des Enthalpieabfalls ($\Delta\Delta H_{3\rightarrow4} = 10.5 \text{ kJ mol}^{-1}$) besteht in der vollständigen Verdrängung des trizyklischen Wasserclusters [5+5+4] aus der Ribose-33-Tasche, welches sich durch einen günstigeren entropischen Beitrag ($-\Delta T\Delta S_{3\rightarrow4} = -4.5 \text{ kJ mol}^{-1}$) ausdrückt.^[117] Hinzukommt eine ligandeninduzierte Umlagerung von Tyr106, wodurch die π - π -Wechselwirkung zu einer *edge to face* Geometrie zum *lin*-Benzoguanin hin wechselt und dadurch einen enthalpischen Beitrag liefert.^[118]

3.5 Zusammenfassung

Zuckerbasierte *lin*-Benzoguanin-Liganden wurden entwickelt, um die Ribose-33-Tasche von *Z. mobilis* TGT zu adressieren. Die durch ITC bestimmten thermodynamischen Profile aller vier Liganden korrelieren mit den durch Röntgenkristallographie bestimmten Strukturmerkmalen, was auf facettenreiche Struktur-Aktivitäts-Beziehungen hinweist. Unter den angewandten Bedingungen binden die Liganden **3.1** – **3.4** exotherm ohne günstigen entropischen Beitrag. Die Acetonid-geschützten Furanosen **3.2** und **3.3** besitzen K_d -Werte im zweistelligen nanomolaren Bereich und zeigen dadurch eine wesentlich höhere Potenz als *lin*-Benzoguanin-Liganden mit Furanosid-Substituenten, die sich zur Ribose-34-Tasche hin orientieren.^[57,92] Die Strukturanalyse hebt die besondere Rolle von Acetonid-geschützten Zuckerresten hervor, die eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung eines trizyklischen [5+5+4]-Clusters um ihre hydrophobe Oberfläche spielen. Die räumliche Kapazität der Ribose-33-Tasche wird durch die Bindung von Ligand **3.4** überschritten, wodurch der Cluster aus der Tasche entfernt wird. Insbesondere die Analyse der lösungsmittelzugänglichen Oberflächen zeigt, dass die Position des polyzyklischen Clusters zwischen dem Zuckeranteil des Liganden und der Proteinoberfläche die Ribose-33-Tasche ideal ausfüllt. Während Röntgenstrukturdaten das thermodynamische Gesamtprofil der Liganden **3.1** – **3.4** im aktiven Zentrum von *Z. mobilis* TGT erklären, stellt das Vorhandensein von Wasserclustern in den Komplexen eine Herausforderung für die detaillierte Interpretation jedes enthalpischen/entropischen Beitrags dar. Die geschützten Kohlenhydratsubstituenten erhöhen nicht nur die Bindungsaffinität, sondern verbessern auch die physikochemischen Eigenschaften (Löslichkeit, $\log D$, $\log P$, mikrosomale Stabilität) der *lin*-Benzoguanin-Liganden. Sie verleihen der Familie der *lin*-Benzoguanin-Liganden eine strukturelle Vielfalt, da ihre Acetonid-Schutzgruppen für strukturelle Steifigkeit mit einer einzigartigen Kombination von polaren und unpolaren Regionen auf der Oberfläche der ungeladenen Moleküle sorgen.

Die vollständige Füllung der Ribose-33-Tasche in den Kristallstrukturen von **3.2** und **3.3** wäre mit anderen Substituenten als den hier berichteten Acetonid-geschützten Zuckern schwieriger zu erreichen. Abgesehen von Einzelfällen^[119–122] sind Acetonid-geschützte Zucker für die Arzneimittelentwicklung bisher nicht umfassend untersucht worden, so dass diese Studie nahe legt, dass diese Reste das Potenzial haben, wichtige Bausteine für die Füllung von Taschen zu werden, die nicht komplementär zu (hetero)aromatischen Ringen oder Heteroalicyclen sind.

3.6 Methoden

Die verwendeten Materialien, Chemikalien, Laborgeräte und Puffer sind in **Kapitel 6** aufgeführt. Allgemeine Methoden, sofern nicht in diesem Kapitel erwähnt, werden ebenfalls in **Kapitel 6** beschrieben.

3.6.1 Proteinexpression und Reinigung von Wildtyp-TGT

Zunächst wurden Zellen in einer Vorkultur (200 mL, LB-Medium, 0.1% (v/v) Ampicillin, 37 °C, 140 rpm) über Nacht angezüchtet, 25 mL dieser Vorkultur in eine Hauptkultur (2 L, LB-Medium, 0.1% (v/v) Ampicillin, 37 °C, 140 rpm) überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7 inkubiert. Die Kultur wurde anschließend für eine Stunde auf 17 °C gekühlt, bevor die Überexpression nach Induktion mittels IPTG bei einer Endkonzentration von 1 mM bei 17 °C und 140 rpm über Nacht folgte. Das LB-Medium wurde durch Zentrifugation (10000 rpm, 4 °C, 10 min; *Avanti J-25*, BECKMAN COULTER) entfernt und das gewonnene Zellpellet in Lysepuffer (25 mL pro 1 L Hauptkultur) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (4 x 4 min, 4 °C, *Duty Cycle* 30%, *Output Control* 7; *Sonifiere 250*, BRANSON). Zur Trennung der unlöslichen Bestandteile wurde die Suspension zentrifugiert (20000 rpm, 4 °C, 60 min; *Avanti J-25*, BECKMAN COULTER) und das Lysat entnommen.

Die säulenchromatographische Reinigung (*ÄKTA_{prime} plus/ÄKTA_{FPLC}*; AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) erfolgte über zwei Schritte. Zunächst wurde das Lysat auf einen Anionenaustauscher (Puffer A äquilibriert; *Highload Q-Sepharose*[™], GE HEALTHCARE) mit einer Geschwindigkeit von 3.5 mL min⁻¹ aufgetragen. Darauffolgend wurde ein Waschschritt mit Puffer A durchgeführt und das Protein mit anschließender fraktionierter Elution mit einem Gradienten von 0% – 40% Puffer B gegen Puffer A vorgereinigt erhalten. Mittels SDS-PAGE identifizierte TGT-enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und auf die *Strep-Tactin[®]XT-Superflow[®]* Säule (Puffer W1 äquilibriert; IBA) mit einer Geschwindigkeit von 2.0 mL min⁻¹ aufgetragen. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen von Nukleinsäuren wurde ein Waschschritt mit Puffer W1 (zehnfaches Säulenvolumen) durchgeführt. Adsorbiertes Protein wurde mit Puffer E1 bis zum erneuten Erreichen der Basislinie eluiert und in Hochsalz-Puffer (1:1) aufgefangen. Zur Entfernung von in Puffer E1 enthaltenem Biotin wurden die vereinigten Fraktionen mit Hilfe eines Konzentrators (*Vivaspin* 30 kDa; 3500 rpm, 4 °C, *Multifuge 3SR*, HERAEUS) auf Hochsalz-Puffer äquilibriert.

Der *Strep-tag[®]II* wurde mittels Thrombin (*Thrombin Cleavage Capture Kit*, NOVAGENE[®]) abgetrennt. Hierzu wurde nach Herstellerangaben Proteinlösung und Thrombin für 18 h bei Raumtemperatur inkubiert, das biotinylierte Thrombin, sowie der abgespaltene *Strep-tag[®]II* durch Zugabe von Streptavidin-Agarose gebunden und durch Filtration (je 500 g, 4 °C, 1 min;

1-14K, SIGMA) abgetrennt. Die aufgearbeitete Proteinlösung wurde zur gewünschten Konzentration von 12 mg mL^{-1} eingengt und nach Schockfrierung bei -80°C aufbewahrt.

3.6.2 Kokristallisation mit Einfachzucker-basierten *lin*-Benzoguaninen zur Adressierung der 33-Ribose-Tasche

Kristalle wurden unter der Verwendung der *Hanging-Drop Vapour Diffusion*-Methode innerhalb weniger Tage bei 18°C erhalten. Dazu wurde Ligand (in DMSO) und Protein (12 mg mL^{-1} in Hochsalz-Puffer) miteinander vermischt. Die erhaltene Proteinlösung (16% DMSO) mit einer zu untersuchenden Konzentration von 3.2 mM Ligand wurde im gleichen Anteil an Volumen des Kristallisationspuffers ($100 \text{ mM MES pH } 5.5$, 1 mM DTT , $10\% \text{ (v/v) DMSO}$, $13\% \text{ (w/v) PEG8000}$) vermischt und auf ein Deckglas überführt. Reservoirvertiefungen wurden mit $650 \mu\text{L}$ des Kristallisationspuffers befüllt und die Deckgläser mit Hilfe von Silikonfett versiegelt.

3.6.3 Datensammlung und Prozessierung

Datensätze der Kristallstrukturen 6FMN und 6FPU (Tabelle S 3.1) wurden am Elektronenspeicherring BESSY II (Helmholtz-Zentrum Berlin, Deutschland) an der *Beamline* 14.1 mit einem DECTRIS *Pilatus 6M* Detektor bei einer Wellenlänge von 0.9184 \AA und 100 K aufgenommen. Vor der Datenerfassung wurden die Kristalle für einige Sekunden in den Cryo-Puffer A überführt und im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Erhaltene Diffraktionsbilder wurden mit Hilfe von *XDS*^[79] indiziert, prozessiert und skaliert. Die Überführung der Reflektionsdatei *XDS_ASCII.HKL* in das MTZ-Format wurde mit *XDSCONV* durchgeführt und eine Teilmenge von zufällig ausgewählten 5% aller Reflexe zur R_{free} -Wert Berechnung verwendet. Alle in diesem Projekt erhaltenen Datensätze wurden in der monoklinen Raumgruppe *C2* prozessiert mit einem TGT-Monomer pro asymmetrischer Einheit und einem Matthews-Koeffizienten von $2.4 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$.

3.6.4 Strukturbestimmung, Verfeinerung und Analyse

Die Phasen der Kristallstrukturen wurde durch die Anwendung des molekularen Ersatzes mit Hilfe des Moduls *Phaser*^[80] aus *CCP4*^[81] bestimmt. Als Suchmodell diente die in der PDB hinterlegte Kristallstruktur mit dem Code 1PUD^[32]. Zwischen den Verfeinerungszyklen mit *phenix-refine* (1.10.1_2155)^[82] wurde *Coot*^[83] zur Modellbuanpassung verwendet. *Simulated Annealing* mit Standard Einstellungen wurden zunächst durchgeführt, gefolgt von weiteren Zyklen mit *Coordinate xyz*, *Occupancy* und *Individual Anisotropic B-Factor* für alle Atome. Strukturen mit anisotroper Verfeinerung wurden anschließend mit Wasserstoffatomen als *riding hydrogens* versetzt, jedoch Wasserstoffe von auftretenden Lösungsmittelmolekülen und Ligand entfernt. Alternative Seitenkettenkonformationen, fehlende Aminosäuren, Wasser-

moleküle wurden in wohldefinierte mF_o-DF_c -Elektronendichte eingebaut und während der Verfeinerung beibehalten, wenn sie in einer $2F_o-F_c$ -Elektronendichte wiedergefunden wurden und die Besetzung größer als 20% war (alternative Seitenkettenkonformationen oder Inhibitoratome). Nur Wassermoleküle, die nach der Verfeinerung durch eine $2F_o-F_c$ Elektronendichte von $\sigma < 1.0$ RMSD, einen B -Faktor nicht signifikant größer als 55 \AA^2 und Abstände zwischen 2.3 \AA und 3.5 \AA zu umgebenden Atomen aufwiesen, wurden in der Struktur behalten. In TGT-3.1 wurde die Besetzung des *lin*-Benzoguanin-Gerüst bei 100% beibehalten, während der Zuckeranteil des Liganden frei verfeinert wurde. Die grafische Darstellung der Kristallstruktur-Koordinaten und Elektronendichte-Karten erfolgte mit *Chimera*^[84].

3.6.5 Messung der thermodynamischen Bindungsprofile

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten (K_d) und der thermodynamischen Profile der untersuchten Liganden gegenüber *Z. mobilis* TGT, wurde ein Microcal ITC₂₀₀ (GE HEALTHCARE) Gerät verwendet. Für die Messungen wurde eigens hergestelltes TGT Protein verwendet, welches unmittelbar vor der Messung steril filtriert wurde. Die Messpuffer (pH 7.8, ITC-Puffer A – C) bestanden aus 50 mM HEPES, Tricin, TRIS, sowie 200 mM NaCl und 0.037% (v/v) Tween 20. Die Messzelle wurde mit TGT im jeweiligen ITC-Puffer und einem Zusatz von 3% (v/v) DMSO zu einer finalen Konzentration zwischen 10 – 30 μM befüllt. Der zu untersuchende Ligand wurde zunächst in DMSO gelöst und mit dem jeweiligem ITC-Puffer A – C Hochsalz-Puffer Gemisch auf eine finale Konzentration von 3% DMSO (v/v) eingestellt. In Abhängigkeit des enthalpischen Signals ($\Delta H^\circ_{\text{obs}}$) wurde die Ligandenkonzentration zwischen 100 – 300 μM gewählt. Die Referenzzelle wurde mit filtriertem demineralisiertem Wasser befüllt.

Unter Standardbedingungen wurden ITC-Messungen bei einer Referenzleistung von $5 \mu\text{cal s}^{-1}$ und einer Rührgeschwindigkeit von 750 rpm durchgeführt. Zur Messung wurde eine initiale Verzögerung von 180 – 300 sec gewählt, mit Abständen von 150 – 180 sec zwischen darauffolgenden Injektionen. Die erste Injektion erfolgte mit 0.3 – 0.6 μL , gefolgt von weiteren Injektionen zwischen 1.0 – 2.4 μL mit einer Injektionsgeschwindigkeit von $0.5 \mu\text{L s}^{-1}$ bis eine Sättigung der enthalpischen Signale ($\Delta H^\circ_{\text{obs}}$) über die Zeit festgestellt wurde. Die Messsignale der Rohthermogramme wurden mit Hilfe von NITPIC^[123] extrahiert sowie integriert und somit die erhaltenen ITC-Isotherme mit SEDPHAT^[124] analysiert. Die in den einzelnen Puffern gemessenen thermodynamischen Profile der Liganden wurden durch globale Analyse unter Anwendung des Modells $A + B \rightleftharpoons AB$ als Hetero-Assoziation bestimmt, wodurch ΔH° und K_d direkt bestimmbar sind. Die Stöchiometrie n der Assoziationsreaktion ergab sich aus dem

Wendepunkt der Isotherme. Aus den Formeln 3.1 und 3.2 können die Bindungsterme ΔG° und $-T\Delta S^\circ$ berechnet.

$$\Delta G^\circ = R T \ln K_d$$

Formel 3.1

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Formel 3.2

Zur Berücksichtigung überlagerter Protonierungseffekte auf das thermodynamische Bindungsprofil wurden Direkttitrationen in drei verschiedenen Puffern (HEPES, Tricin, TRIS)^[71,125] durchgeführt. Diesbezüglich wurden die vermessenen $\Delta H^\circ_{\text{obs}}$ -Werte auf der Ordinate und die zugehörige Ionisierungsenthalpien des entsprechenden Puffers ($\Delta H^\circ_{\text{ion}}$) auf der Abszisse aufgetragen.^[126] Aus der Steigung der linearen Regressionslinie kann die Anzahl aufgenommener bzw. abgegebener Protonen pro Mol gebildetem Protein-Ligand-Komplex geschlossen werden. Der Ordinatenabschnitt gibt anschließend die korrigierte Bindungsenthalpie ($\Delta H^\circ_{\text{bind}}$) hinsichtlich der Protonierungseffekte bei der Bildung des Protein-Ligand Komplexes wieder (Formel 3.3).

$$\Delta H^\circ_{\text{obs}} = \Delta H^\circ_{\text{bind}} + n_{H^+} \cdot \Delta H^\circ_{\text{ion}}$$

Formel 3.3

Zusätzliche Wärmebeiträge die durch Verdünnungen entstanden sind, wurden um die Werte der konstanten finalen Injektionen auf alle gemessenen Wärmesignale verrechnet. Die Darstellung der integrierten Rohdaten der gemessenen Thermogramm erfolgte durch das Programm GUSSE.^[127] Die daraus resultierenden thermodynamischen Werte im jeweiligen Puffer stellen den Mittelwert von mindestens drei Messungen dar.

3.6.6 Synthese der untersuchten TGT-Inhibitoren

Die Synthese der Liganden wurde von DR. ELISABETH SCHÄFER innerhalb einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe DIEDERICH (ETH Zürich, Schweiz) durchgeführt. Die ausführliche Beschreibung der Synthesewege wurde in einer Veröffentlichung publiziert.^[128]

3.7 PDB Zugangscodes

Koordinaten, sowie Strukturfaktoren von TGT in Komplex mit Liganden **3.1** bis **3.4** wurden in der *RCSB Protein Data Bank* (PDB) mit den Zugangscodes 6FMN (**TGT-3.1**) und 6FPU (**TGT-3.4**) hinterlegt. Protein-Ligand Komplexe 5JSV (**TGT-3.2**) und 5JSW (**TGT-3.3**) wurden von DR. FREDERIK R. EHRMANN deponiert.

3.8 Generelle Informationen

3.8.1 Kristallographische Tabelle

Tabelle S 3.1 Datensammlung und Verfeinerungsstatistik für die Kristallstrukturen **TGT · 3.1–3.4**.

TGT·Chapter.Ligand	TGT-3.1	TGT-3.2	TGT-3.3	TGT-3.4
PDB ID	6FMN	5JSV	5JSW	6FPU
(A) Data collection and processing				
Collection site	BESSY 14.1	DESY P14	DESY P14	BESSY 14.1
No. crystals used	1	1	1	1
Wavelength λ [Å]	0.91841	0.9763	0.9763	0.91841
Space group	<i>C2</i>	<i>C2</i>	<i>C2</i>	<i>C2</i>
Unit cell parameters				
a [Å]	89.7	90.5	90.3	88.6
b [Å]	64.3	95.2	65.0	64.7
c [Å]	70.7	70.6	70.8	70.5
β [°]	93.2	96.4	96.4	93.5
(B) Diffraction data				
Resolution range [Å]	44.77 – 1.36 (1.42 – 1.36)	43.58 – 1.17 (1.24 – 1.17)	44.89 – 1.22 (1.29 – 1.22)	44.23 – 1.36 (1.44 – 1.36)
Unique reflections	86840 (13420)	134123 (20280)	114740 (17773)	83360 (12915)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	8.1 (44.6)	3.7 (27.3)	4.1 (41.8)	4.5 (49.6)
Completeness [%]	96.9 (93.1)	97.4 (91.2)	95.2 (91.5)	96.8 (93.0)
Redundancy	3.3 (3.1)	4.0 (3.3)	4.2 (4.1)	3.6 (3.5)
$I/\sigma(I)$	9.0 (2.0)	19.0 (4.3)	17.1 (3.0)	14.3 (2.1)
Wilson B -factor [Å ²]	11.5	11.6	12.8	14.6
Matthews Coefficient [Å ³ ·Da ⁻¹] ^[a]	2.4	2.4	2.4	2.4
Solvent content [%] ^[a]	47.6	48.9	48.7	48.0
Molecules in asymmetric unit	1	1	1	1
(C) Refinement with Phenix				
PHENIX version	1.10.1 – 2155	1.10.1 – 2155	1.10.1 – 2155	1.10.1 – 2155
Resolution range [Å]	44.8 – 1.36	40.0 – 1.17	30.2 – 1.22	44.2 – 1.36
Reflections used for R_{free}	4197	6707	5737	4162
Reflections used for R_{work}	79740	127416	109003	79067
Final R values				
R_{free} [%]	15.5	13.9	14.4	15.4
R_{work} [%]	12.2	12.1	12.5	12.8
No. of atoms (non-hydrogen)				
Protein atoms	2998	3073	3081	2943
Water molecules	415	474	405	373
Ligand atoms	25	29	33	30
RMSD from ideality				
Bond angles [°]	1.0	0.9	0.8	0.9
Bond length [Å]	0.007	0.005	0.005	0.007
Ramachandran plot^[b]				
Most favoured regions [%]	95.0	94.0	94.7	94.9
Additionally allowed regions [%]	4.7	5.7	5.0	4.7
Generously allowed regions [%]	0.3	0.3	0.3	0.3
Mean B-factors [Å²]^[c]				
Protein atoms	14.4	14.7	15.5	20.2
Water molecules	29.8	33.4	34.2	34.4
Ligand atoms	18.3	15.7	21.0	20.3

Die Schale mit der höchsten Auflösung wird durch Werte in Klammern beschrieben. ^[a] Matthews coefficient und solvent content wurden mit dem Programm *Matthews_coef* aus der CCP4-Reihe (8.4) berechnet. ^[81]

^[b] Ramachandran-Plots wurden mit *PROCHECK*^[85] und ^[c] mittlere B -Faktoren wurden mit *MOLEMAN*^[86] berechnet.

3.8.2 ITC Messungen

Puffer-Ionisationsreaktion während der TGT-Ligand-Komplexbildung

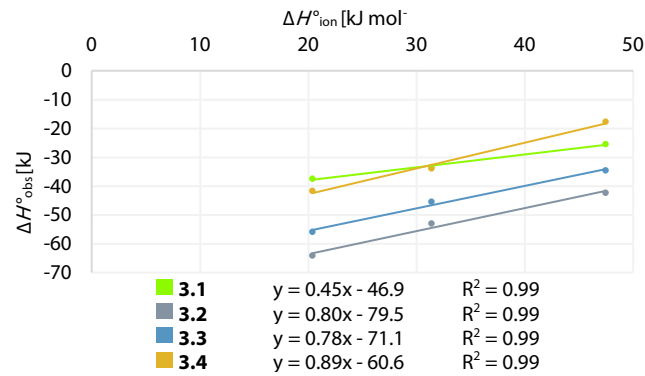
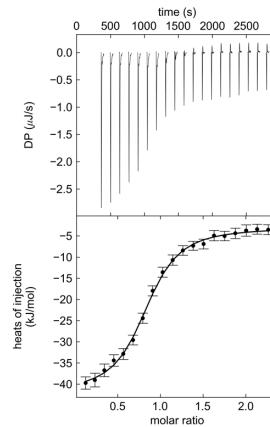
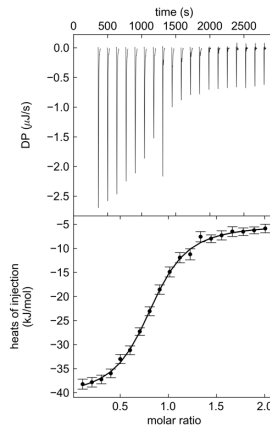
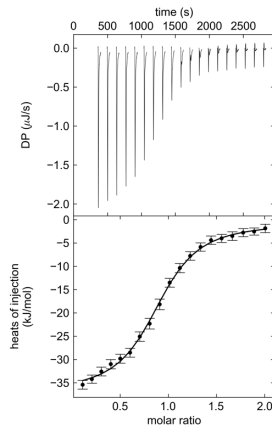
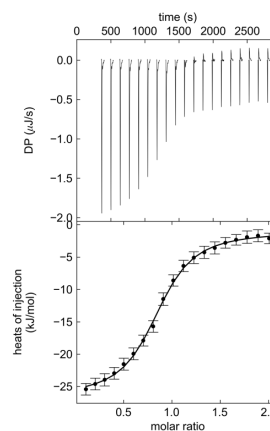
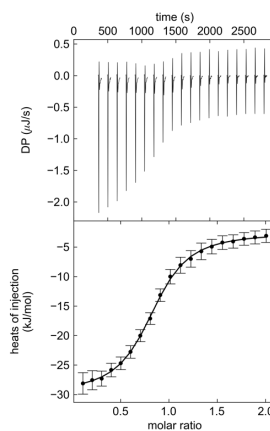
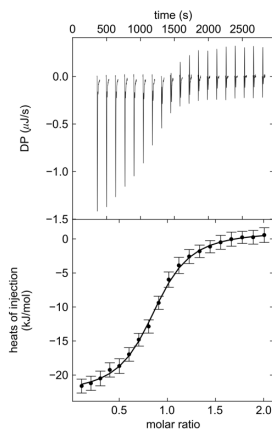


Abbildung S 3.1 Gemessene Enthalpien ($\Delta H^\circ_{\text{obs}}$) der Liganden **3.1** – **3.4** wurden gegen die Ionisationsenthalpie ($\Delta H^\circ_{\text{ion}}$) der jeweiligen Puffer (HEPES, Tricin, TRIS) bei einem pH von 7.8 aufgetragen, um die korrigierten Enthalpien der Bindung ($\Delta H^\circ_{\text{bind}}$) zu erhalten.

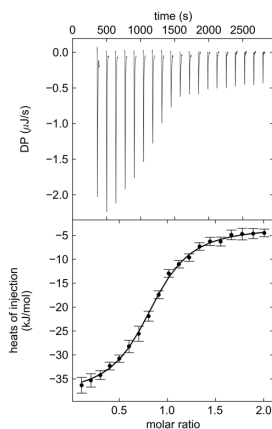
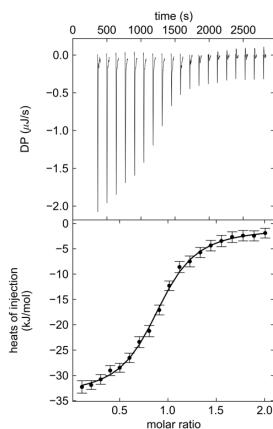
Rohdaten der ITC



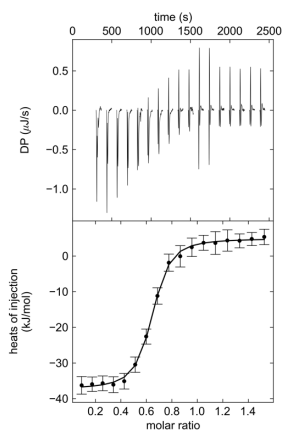
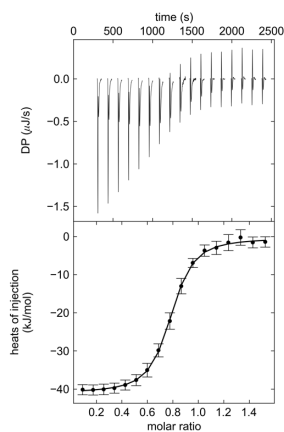
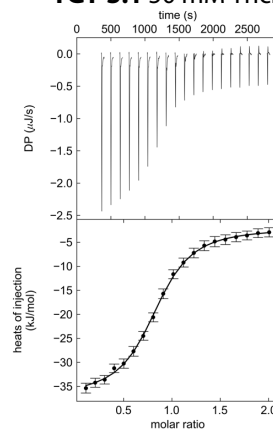
TGT-3.1 50 mM HEPES



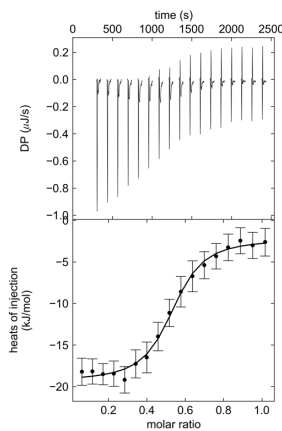
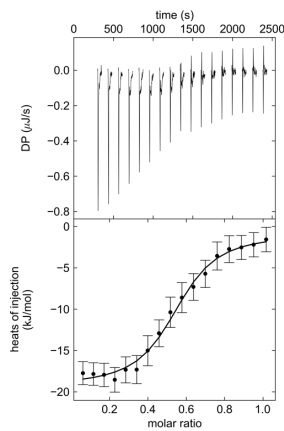
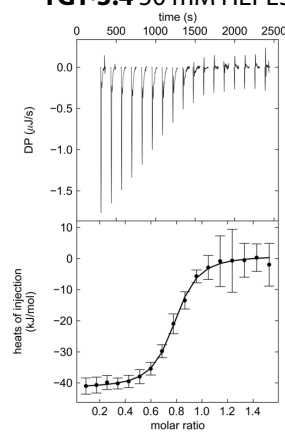
TGT-3.1 50 mM TRIS



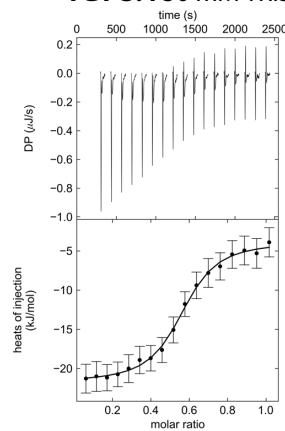
TGT-3.1 50 mM Tricin



TGT-3.4 50 mM HEPES



TGT-3.4 50 mM TRIS



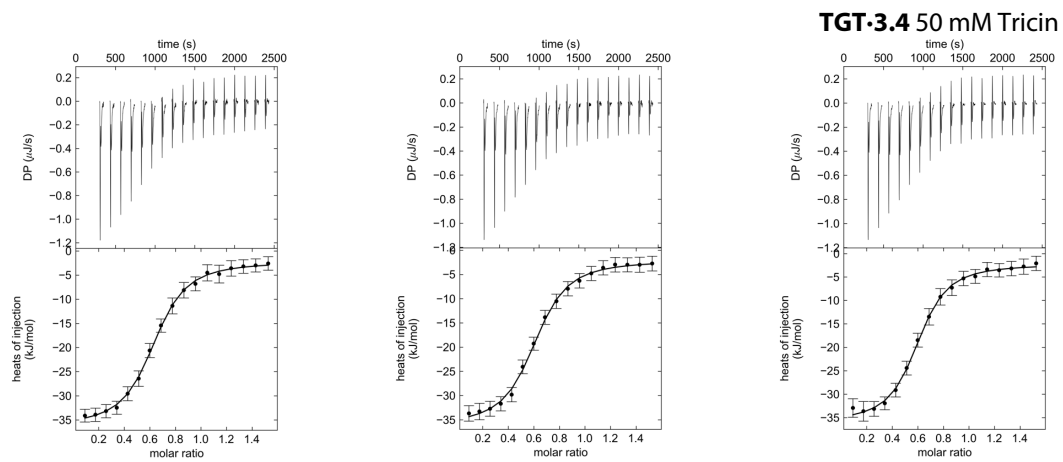


Abbildung S 3.2 ITC-Messdaten von **TGT-3.1** und **TGT-3.4** in dreifacher Ausführung in 50 mM HEPES/TRIS/Tricin bei pH 7.8 Das obere Feld zeigt die extrahierten Peaks der Titrationskurve. Das untere Feld zeigt die Werte der integrierten Peaks durch automatische Ausführung des *NITPIC*-Algorithmus. Die Anpassung an ein 1:1-Bindungsmodell und die Erzeugung der Bindungsisotherme wurde von *SEDPHAT* durchgeführt.

4

Kapitel 4

Störung der essentiellen Protein-Protein-Interaktionen zur Hemmung der Dimer Kontaktbildung in der tRNA-Guanin-Transglycosylase

A. NGUYEN¹, L. HEYDER², A. HEINE¹, W. DIEDERICH², G. KLEBE¹

¹Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg,
Marbacher Weg 6–10, 35037 Marburg, Deutschland

²Zentrum für Tumor- und Immunbiologie, Philipps-Universität Marburg,
Hans-Meerwein-Straße 3, 35043 Marburg, Deutschland

4.1 Vorwort

Das Projekt wurde aufbauend auf den Ergebnissen der Masterarbeit des Autors fortgeführt. Die genutzte Disulfid-Bibliothek zum *Tethering*-Projekt wurde von THOMAS KRONENBERGER (Arbeitsgruppe PROF. DR. GERHARD KLEBE, Philipps-Universität Marburg, Deutschland) hergestellt. Die Synthese weiterer Zielverbindungen wurde von LUKAS HEYDER (Arbeitsgruppe PROF. DR. WIBKE DIEDERICH, Philipps-Universität Marburg, Deutschland) durchgeführt. Reinigung des Proteins, Analysen der Protein-Ligand-Reaktionen, sowie Röntgenkristallstrukturanalysen wurden vom Autor dieser Arbeit ausgearbeitet. Alle massenspektrometrischen Analysen wurden von der Serviceabteilung der Chemie unter der Leitung von DR. UWE LINNE (Serviceabteilung Massenspektrometrie und Elementanalytik, Philipps-Universität Marburg, Deutschland) durchgeführt.

4.2 Kurzfassung

Das Disulfid-*Tethering* wurde auf die disulfidverbrückte TGT-Variante C158S/C281S/Y330C/H333A aus *Zymomonas mobilis*, unter Verwendung der hauseigenen Disulfid-Bibliothek angewendet und mit Hilfe von Massenspektrometrie untersucht. Der eingeführte Cysteinrest an Position 330 inmitten des aromatischen *Hot Spots* dient als Ankerpunkt für die Modifikation und führt zur Destabilisierung der Dimerrenzfläche. Darüber hinaus wurde der vielversprechendste Treffer aus dieser Serie in ein irreversibel bindendes *Tether*-Molekül chemisch umgestaltet. Abgesehen von diesen Serien wurden Acrylamide als hochpotente Substanzen zur Modifizierung des Ankers identifiziert und zeichnen sich durch eine stabile chemoselektive Cystein-Biokonjugation unter milden Reaktionsbedingungen aus.

4.3 Einleitung

4.3.1 *Tethering*: Fragment-basiertes Wirkstoffdesign

Das fragmentbasierte Wirkstoffdesign (FBWD) ist in den letzten Jahrzehnten zu einem wichtigen Bestandteil der Arzneimittelentwicklung geworden und konnte auf eine zunehmende Zahl biologischer Systeme angewandt werden.^[129] Der Ansatz erlaubt die Herstellung von niedermolekularen Inhibitoren, indem ein oder mehrere schwach bindende wirkstoffähnliche Fragmente identifiziert werden. Er ermöglicht somit die Identifizierung von Ansatzpunkten für die Suche nach Leitstrukturen. Die gefundenen Treffer können durch Verknüpfung und schrittweise Vergrößerung der Fragmente zu größeren Wirkstoffkandidaten optimiert werden. Darüber hinaus erzielt FBWD höhere Trefferraten und deckt damit den chemischen Raum mit deutlich weniger Molekülen mehr ab als das Hochdurchsatz-Screening (HTS, *high throughput screening*) bei dem in einer Kampagne oft mehr als eine Millionen Substanzen getestet werden. Im Vergleich dazu werden bei fragmentbasierten Ansätzen wenige tausend Verbindungen benötigt, die allerdings in ihrem Molekulargewicht deutlich kleiner sind. Darüber hinaus neigen Fragmente dazu, an adaptive Regionen von Proteinen zu binden, wie z.B. Protein-Protein-Oberflächen und allosterische Zentren, die von HTS-Substanzen nur schwer adressiert werden können.^[130–132] Interessanterweise wurden in mehreren Fällen potente Leitstrukturen durch fragmentbasiertes Wirkstoffdesign hergestellt, obwohl das konventionelle Hochdurchsatz-Screening keine prospektiven Leitstrukturen ergab. Dies deutet darauf hin, dass HTS-Bibliotheken möglicherweise keine ausreichende chemische Vielfalt für bestimmte Zielstrukturen aufweisen, während ein fragmentbasierter Ansatz die erforderliche Vielfalt im chemischen Bereich erfolgreicher abdecken kann.^[133]

Verschiedene Methoden bieten sich an, um eine bestimmte Zielstruktur mit Fragmenten zu durchleuchten. Unter anderen liefern Bindungsassays wie Kernspinresonanz (NMR, *nuclear magnetic resonance*) und Röntgenkristallographie erste strukturelle Informationen über den Bindungsmodus von gebundenen Fragmenten an das Zielprotein. Mit biophysikalischen Methoden wie z.B. der Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC, *isothermal titration calorimetry*), Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR, *surface plasmon resonance spectroscopy*) oder Mikroskaligen Thermophorese (MST, *microscale thermophoresis*) können Informationen über die Affinität der Fragmente zum Zielprotein liefern. Nichtsdestotrotz bieten alle genannten Methoden ihre eigenen spezifischen Vor- und Nachteile. Insbesondere geringe Sensitivität, begrenzte Anwendbarkeit, hohes Proteinvolumen für den Assay oder aufwändige Assay-Optimierungen erfordern eine Abschätzung zwischen Kosten und Nutzen beim Einsatz einzelner Methoden.

Aufgrund ihrer Größe und ihres begrenzten Interaktionspotenzials neigen Fragmente dazu, eine geringe Affinität zum Zielprotein aufzuweisen, was sie in Assays oft unentdeckt lässt. Um

ihre Affinität zu messen, ist es notwendig, die Fragmente in hohen Konzentrationen zu verwenden, was einerseits zu Löslichkeitsproblemen und andererseits zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Insbesondere falsch positive Binder können an eine große Anzahl von Proteinen binden, indem sie bei hohen Konzentrationen zur Aggregation neigen.^[134] Häufig stellt die Kristallisation von Protein-Fragment-Gemischen eine große Herausforderung dar, da die Kristallisationsbedingungen eines Proteins stark von äußeren Einflüssen, wie z.B. den zugesetzten Ligandenkonzentrationen abhängig sind. Darüber hinaus zerbrechen Proteinkristalle oft beim Einweichen oder Tränken (*soaking*) in Lösungen mit hohen Ligandenkonzentrationen. Doch selbst im Falle eines erfolgreichen Tränkens- oder Kokristallisations-experiments fehlt einer solchen Kokristallstruktur oft eine ausreichende differentielle Elektronendichte um den Bindungsmodus des gebundenen Fragments zu ermitteln. Dies kann verschiedene Gründe haben, z.B. ist die Konzentration nicht ausreichend oder das Fragment nimmt mehrfache Konformationen oder Orientierungen an, die zu einer niedrigen Besetzung des einzelnen Anordnungsplatzes des Fragments in der Kristallstruktur führen, so dass die erhaltene differentielle Elektronendichte kaum interpretiert werden kann.

Im Gegensatz zu Enzym-Substrat-Wechselwirkungen verlaufen Protein-Protein-Wechselwirkungen (PPI, *protein-protein-interaction*) üblicherweise über flache Oberflächen oder breite, flache Taschen, die von großen Peptidpitopen erkannt werden. Schwierigkeiten entstehen dadurch, dass die Peptidpitope durch eine einzelne Region von Polypeptiden, wie z.B. einer α -Helix, oder durch eine Reihe unverbundener Segmente einer oder mehrerer Proteindomänen definiert sind. Darüber hinaus weisen Proteinoberflächen divergierende physikalische Eigenschaften auf, die durch eine beträchtliche Anzahl polarer und unpolarer Wechselwirkungen gekennzeichnet sind und deren individuelle Beiträge variieren. Darüber hinaus treten Protein-Protein-Wechselwirkungen nur in eng definierten Bereichen der Oberfläche auf, die auch *Hot Spots* genannt werden und hauptsächlich für die Bindungsstärke zwischen Proteinen verantwortlich sind.^[135–137]

Insbesondere die Identifizierung kleiner chemischer Fragmente, die sich nur sehr schwach an biologische Zielstrukturen wie PPI und flache Taschen binden lassen, stellt eine große Herausforderung dar. Unter den auf Fragmenten basierenden Ansätzen ist das Disulfid-*Tethering*, entwickelt von J. WELLS und Mitarbeitern der Firma SUNESIS in San Francisco, insofern einzigartig, als es eine kovalente, reversible Bindung verwendet, um die Wechselwirkung zwischen einem Fragment und einem Zielprotein zu stabilisieren.^[138] Lediglich 30 bis 50 mg Protein wird für das Screening von 10000 Verbindungen benötigt und erlaubt insbesondere den Nachweis von Fragmenten die mit schwacher Affinität zum Zielprotein binden. Während identifizierte Fragmente oft schwache Liganden sind, wird die Röntgenkristallographie der Protein-Fragment-Konjugate oft durch die kovalente Bindung erleichtert. Um die Methode anwenden zu können, muss ein Cysteinrest innerhalb oder in unmittelbarer

Nähe der zu untersuchenden Position vorhanden sein. Ein Abstand von 5 – 10 Å zum interessierenden Ort erscheint hierbei am günstigsten. Falls in diesem Bereich des Proteins kein Cysteinrest vorhanden ist, kann er durch gezielte Mutagenese eingebracht werden. Der allgemeine Prozess ist in Abbildung 4.1 zusammengefasst.

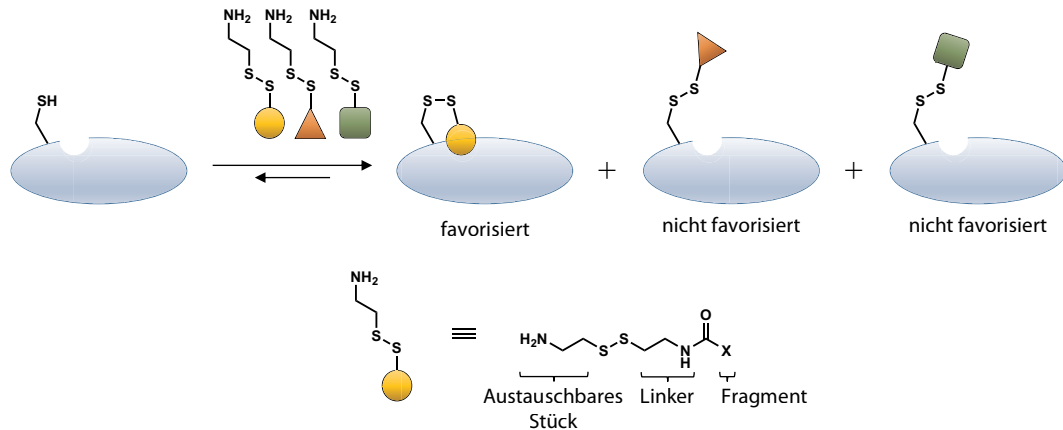


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des Disulfid-*Tetherings*. Ein Fragment wird bevorzugt gebunden und reagiert unter Ausbildung einer Disulfidbrücke, wenn eine Affinität zum Protein besteht. Das *Tether*-Fragment besteht aus einem variablen Fragmentanteil, der Linkereinheit und der austauschbare Baustein, der als Aminothiol freigesetzt wird, wenn das Fragment eine Disulfidbindung mit dem Protein eingeht. Chemisch handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion in der die Disulfidverknüpfung vom eingesetzten Reagenz auf die Thiolgruppe des Proteins übertragen wird.

Der Cysteinrest dient als Ankerpunkt, um Fragmente mit einer Thiolgruppe, die sich in der Nähe des Cysteinrests befindet, zu binden. Das Protein wird entweder einzeln oder mit einem *Pool* thiolhaltiger, niedermolekularer Fragmente inkubiert, die zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit an ein Thiol wie Cysteamin konjugiert sind. Die Reaktion beinhaltet die zeitnahe Spaltung und Bildung einer stabilen kovalenten Disulfidbindung (S—S; Bindungsenergie ca. 60 kcal mol⁻¹). Sie ist bei Raumtemperatur in wässriger Umgebung bei physiologischem pH-Wert reversibel und die Geschwindigkeit der Reaktion ist mit einer Halbwertszeit von etwa zwei Stunden für Konzentrationen im mM-Bereich relativ schnell. Der Thiol-disulfid-Austausch ist selbst eine S_N2-Reaktion, bei der das Thiolat-Anion des Thiols (RS⁻) nukleophil von der Rückseite der Disulfidbrücke aus angegriffen wird (Gleichung 4.1-3).^[139]



Die Reaktionsbedingung kann durch Wahl der Redox-Bedingungen bestimmt werden, so dass der Cysteinanker am Protein mit den einzelnen Fragmenten reversibel Disulfidbindungen eingehen kann. Bei fehlender Affinität zwischen Fragment und Protein wird keines der Fragmente bevorzugt gebunden, so dass eine statistische Mischung aus Protein-Fragment-

Komplexen, sowie unmodifiziertem Protein und Cysteamin-modifiziertem Protein entsteht. Liegt eine ausreichende Affinität zwischen dem Fragment und dem Protein vor, wird das entstehende Konjugat stabilisiert und der Komplex überwiegt gegenüber allen anderen Fragmenten. Gebundene Fragmente können durch Massenspektrometrie der Gleichgewichtsmischung analysiert werden. Aufgrund des charakteristischen Molekulargewichts der Fragmente können die entsprechenden Konjugate über das angefügte Gewicht identifiziert werden. Identifizierte Fragmente dienen dann als Ausgangspunkte für die Umwandlung in nicht-kovalente Liganden durch chemische Optimierung und Entfernung der Thiol-Funktionalität.

Ein zusätzlicher Faktor, der bei einer erfolgreichen Bindung eines *Tethers* eine Rolle spielt, ist die Kettenlänge des Linkers zwischen bindender Thiolgruppe und Fragment. Der entropische Effekt des Linkers bezieht sich auf die Wahrscheinlichkeit, wie der Linker die bevorzugte Konformation am Fragment stabilisiert. Zum einen beeinflusst die Linkerlänge den *Tethering*-Prozess, zum anderen spielt die Proteindynamik am Ziel-Cystein eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Linkerlänge. Daher variiert die entropische Komponente erheblich je nach Linker und kann einen starken Einfluss auf die Gesamtkonjugationsstärke nehmen (Abbildung 4.2).

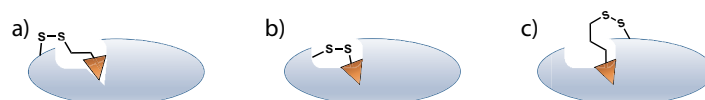


Abbildung 4.2 Drei mögliche *Tethering*-Szenarien mit dem gleichen Fragment, aber unterschiedlichen Linkerlängen und unterschiedlich platzierten Cysteinresten. **a)** Der Linker ist zu kurz, wodurch das Fragment nicht effektiv anbinden kann. **b)** Die optimale Länge des Linkers liefert einen großen entropischen Beitrag zur Konjugationsenergie des Fragments. **c)** Das Fragment erhält nur wenige entropische Bindungsvorteile, da der Linker länger als erforderlich ist und hierdurch Restflexibilitäten aufweist.

4.3.2 Zielprotein TGT Y330C

Zur Destabilisierung des TGT-Homodimers wurde von DR. STEPHAN JAKOBI eine Reihe von Mutanten angelegt, die die Aminosäuren den aromatischen *Hot Spot* (Trp326, Tyr330, His333 und Phe92', siehe auch **Kapitel 5**) betreffen.^[38,39] Eine Besonderheit zeigte sich in der Kristallisation der TGT-Mutante Y330C, die eine Veränderung der Packung mit einem Übergang der Raumgruppe *C2* zu *P6₅22* ergab. Die Kristallstrukturanalyse zeigt, dass während der Kristallisation, vermutlich durch Luftsauerstoff oxidiert, eine Disulfidbrücke zwischen Cys330 und Cys330' eines weiteren Monomers gebildet wird, die die übliche Dimer-Anordnung verhindert (Abbildung 4.3). Die neu gebildete Grenzfläche zwischen den ehemaligen Monomeren im Bereich der Disulfidbindung beträgt nur 571 Å² und ist damit nur etwa ein Drittel so groß wie das nicht-kovalent verknüpfte Dimer. Die ursprünglichen Monomere (ein Monomer pro asymmetrische Einheit) werden durch eine zweizählige Drehachse senkrecht zur

neu gebildeten Disulfidbrücke aufeinander abgebildet. Im Folgenden werden die kovalent gebundenen Y330C-Monomere der Übersichtlichkeit halber als reversibles "Dimer" bezeichnet.

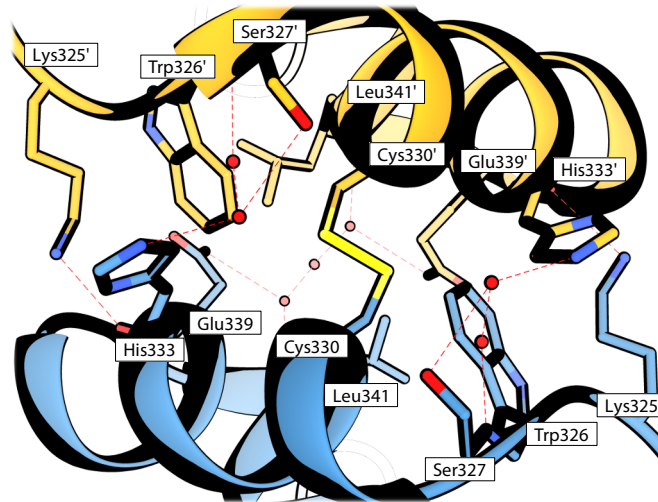


Abbildung 4.3 Darstellung der Proteinkontaktfläche zwischen den disulfidverbrückten Monomeren in der TGT-Variante Y330C in der Raumgruppe $P6_522$ (Code: 4JBR)^[unveröffentlicht]. Die beiden Monomere (blau und orange) sind über die in der Mitte der Abbildung gezeigte kovalente Disulfidbrücke (2.0 Å) miteinander verbunden. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau, S = gelb.

Neben der artifizell gebildeten Disulfidbindung, erstrecken sich die Protein-Protein-Wechselwirkungen in der "Dimer"-Grenzfläche vorwiegend über wasservermittelte Wasserstoffbrücken. Durch die Symmetrie des "Dimers" findet jede Wechselwirkung innerhalb der Grenzfläche mit Ausnahme der kovalenten Bindung zweimal statt. Die Reste His333 mit Ser327' und umgekehrt werden durch zwei Wassermoleküle miteinander verbunden. Weiterhin befindet sich ein symmetrisch angeordneter Wassercluster, der die Seitenketten Glu339/Glu339' mit der Hauptkette von Leu341/Leu341' verbindet. Letztlich findet noch eine Wechselwirkung zwischen der Seitenkette Lys325 und der Hauptkette von His333' statt. Ursprüngliche Wechselwirkungen, die aus dem Wildtyp-Homodimer bekannt sind, werden in der neuen Orientierung nicht wiedergefunden. Mit der Mutation Y330C wird der aromatische *Hot Spot*, der ursprünglich für die Stabilität der Dimerbildung im Wildtyp-Protein verantwortlich ist, aufgehoben. Durch die Einführung von Cys330 wird zunächst der aromatische Charakter in dieser Position entfernt, wodurch Trp326 und His333 voneinander isoliert werden. Der letzte aromatische Rest Phe92' aus dem *Hot Spot* wird durch die Umorientierung räumlich weit voneinander getrennt, so dass sein Beitrag innerhalb des aromatischen Clusters ebenfalls entfällt.

Mit Überführung des ursprünglichen Dimers in eine neue Grenzfläche des disulfidverbrückten "Dimers" ändert sich die Anordnung erheblich gegenüber der des nicht-kovalent gebundenen Dimers im Wildtyp. In Abbildung 4.4 ist die überlagerte Struktur des disulfidverbrückten

"Dimers" über die Oberflächendarstellung des Wildtyp-Proteins dargestellt. Die Überlagerung zeigt, dass das gelbe Monomer des disulfidverbrückten Monomers um 180° gedreht ist und somit eine Position außerhalb der ursprünglichen Position einnimmt. Hierdurch wird die ursprüngliche Dimer-Grenzfläche aufgelöst und großflächig freigelegt. Trotz des scheinbar unbesetzten Freiraums in der Kristallpackung liegen keine Umstrukturierung der Sekundärstrukturelemente vor, obwohl dies durch die Aufhebung von Protein-Protein-Interaktionen in der ehemaligen Grenzfläche begünstigt wird. Lediglich der Schleifenbereich 46 bis 52 nimmt eine andere, auf das Lösungsmittel ausgerichtete Anordnung an (Abbildung 4.4, in rot dargestellt).

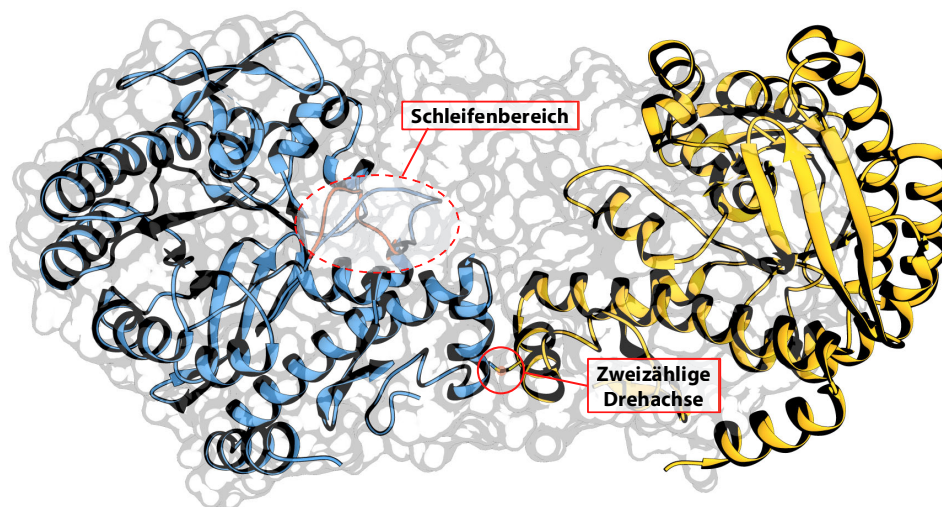


Abbildung 4.4 Vergleich der TGT-Homodimere in den Raumgruppen $P6_522$ ($C_{\text{gelb+blau}}$, PDB Code: 4JBR)^[unveröffentlicht] und $C2$ (Oberfläche_{grau}, PDB Code: 1PUD)^[32]. Die beiden Monomere auf der linken Seite wurden übereinandergelegt. Der gelbe Dimerpartner, der durch eine kovalente Bindung verbunden ist, ist um 180° gegenüber seiner ursprünglichen Position im Wildtypen verdreht. Der Schleifenbereich 46 bis 52 (Bestandteil des Schleifen-Helix-Motivs) nimmt in der neuen Anordnung eine alternative Packung an. Der ursprüngliche Verlauf in der Raumgruppe $C2$ (C_{rot} , PDB Code: 1PUD)^[32] ist in rot dargestellt.

Bei Neuorientierung des Schleifenbereichs wird eine aus hydrophoben Aminosäuren bestehende Subtasche freigelegt. Darin eingebettet sind ein Dimethylsulfoxid (DMSO) und ein aus vier Molekülen bestehendes Wassernetzwerk (Abbildung 4.5b). Das DMSO ist als ein Bestandteil des Cryo-Puffers, der zum Einfrieren des Proteinkristalls verwendet wurde, in die Kristallstruktur eindiffundiert. Eingebettet im Schleifenbereich bildet das DMSO-Molekül Wasserstoffbrückenbindungen zu den Amidgruppen von Gly46 und Ala49, sowie zu der Hauptkette von Met93. Die vier Wassermoleküle füllen den restlichen Raum der hydrophoben Tasche und werden durch Wasserstoffbrücken innerhalb der Tasche gebunden (Thr47, Lys52 und Met344, nicht dargestellt). Die dargestellte Konformation der Schleifenregion ist bei Kristallpackung in der Raumgruppe $C2$ aus sterischen Gründen nicht möglich, da sich die Schleife sonst mit dem Dimerpartner überlappen würde (Abbildung 4.5c). Es wird angenommen, dass die lösungs-

mittelexponierte Schleifenanordnung nur im monomeren Zustand und somit in Lösung vorliegt, dagegen in der C2-Packung des Wildtyp-Proteins in einen anderen Verlauf aus sterischen Gründen gezwungen wird.

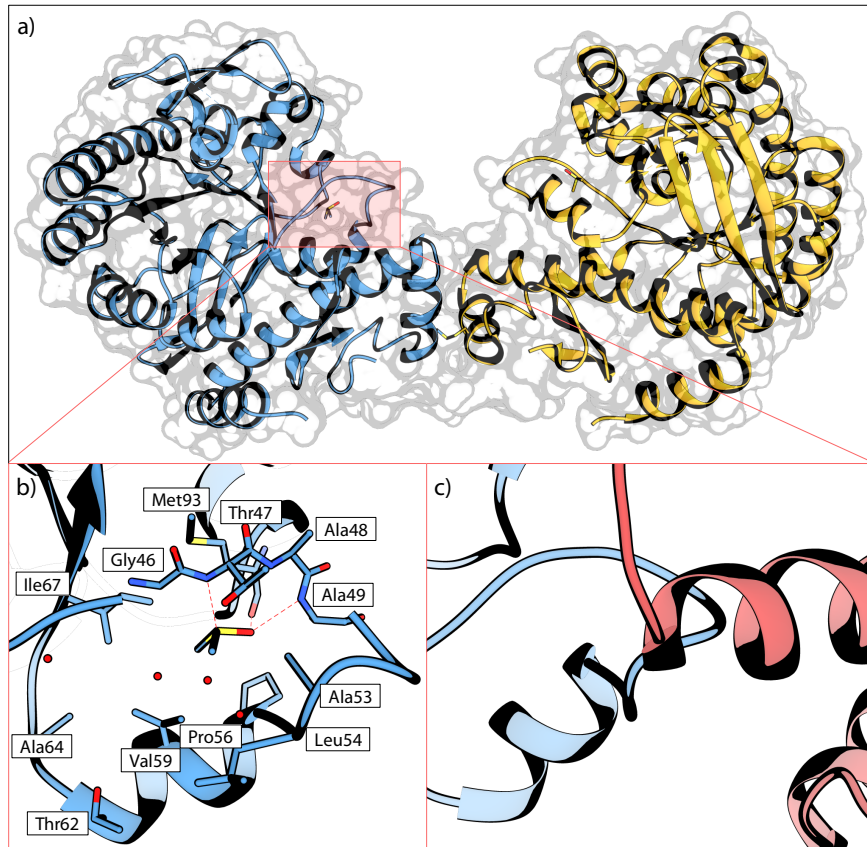


Abbildung 4.5 a) Darstellung der TGT-Mutante Y330C (C_{blau+gelb}, Oberfläche_{grau}, PDB Code: 4JBR)^[unveröffentlicht]. b) Detailansicht des Schleifen-Helix-Motivs (Aminosäuren 47 bis 62), in dem ein DMSO-Molekül eingebettet ist. c) Anordnung des Motivs wäre in der C2-Raumgruppensymmetrie aufgrund sterischer Wechselwirkungen nicht möglich. Der Dimerpartner in der C2-Raumgruppe ist in rot, während das Schleifen-Helix-Motivs in der P6_s22-Packung in blau dargestellt ist.

4.3.3 Zielsetzung

Die DMSO-Tasche ist Teil des Schleifen-Helix-Motivs, das großen Einfluss auf die Dimerstabilität und damit auf die Dimeranordnung ausübt (siehe **Kapitel 2** und **5**). Nach erfolgreicher Monomerisierung des Dimers, aufgrund ungünstiger Lösungskanaläle in der P6_s22 Raumgruppe, kann die Tasche mit unpolaren Bausteinen oder einem potenziellen Liganden auf Sulfoxidbasis adressiert werden, wodurch die Tasche in einer ungünstigen Anordnung stabilisiert wird, die die Ausbildung des Dimers verhindert. Um die Monomerisierung des disulfidverbrückten "Dimers" in TGT Y330C zu erzwingen, wurde der eingeführte Cysteinrest als Anker für *Tethering*-Experimente verwendet, wobei bindende Fragmente die Disulfid-

ausbildung zwischen zwei TGT-Y330C-Monomeren zur disulfidverbrückten Variante unterdrücken und Wechselwirkungen innerhalb des nicht-kovalent angeordneten Dimers abschwächen.

Für dieses Projekt wurde die TGT-Variante C158S/C281S/Y330C/H333A untersucht, die in einer vorherigen Arbeit freundlicherweise von TRAN XUAN PHONG NGUYEN (Arbeitsgruppe PROF. DR. GERHARD KLEBE, Philipps-Universität Marburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. Um Reaktionen an anderen Cysteinresten des Enzyms zu verhindern, wurden die Reste Cys158 und Cys281 durch Serin ersetzt. Die Mutation an His333, die ebenfalls zur Dimerstabilisierung beiträgt, führt zu einem Verlust eines aromatischen Rests in dem stabilisierenden Cluster aus vier aromatischen Resten in der Kontaktfläche (s. **Kapitel 5**) und Wasserstoffbrückenausbildung an dieser Stelle. Die Einzelmutation H333A (PDB Code: 6YRY und 6H7C) führt zu keiner strukturellen Veränderungen des Enzyms. Infolgedessen wird der aromatische Cluster durch die zwei eingeführten Mutationen in seiner Stabilität stark beeinträchtigt und führt zur Minderung des Dimerzusammenhalts. Somit wird die Kristallisation der Variante in der *P*₆₅₂₂-Raumgruppe erleichtert.

4.4 Ergebnisse

4.4.1 Disulfid-*Tethering*

Zur Vergleichbarkeit wurden die identischen Bedingungen, wie in der Masterarbeit des Autors beschrieben, gewählt. Hierzu wurden die Bedingung 15 μ M TGT C158S/C281S/Y330C/H333A, 10% DMSO, 600 μ M Dithiothreitol (DTT) und 200 μ M Tether-Fragment für das Screening der TK-*Tether*-Bibliothek (Abbildung S 4.1) genutzt.^[73] Die TK-Verbindungen sind an eine Aminothiol-Gruppe mit gleicher Linkerlänge des entsprechenden Fragments verbunden, die zur Erhöhung der Löslichkeit dienen. Bei der massenspektrometrischen Auswertung wird jedoch auch die Umsetzung des freien Aminothiolrestes mit dem Cys330 der TGT beobachtet,

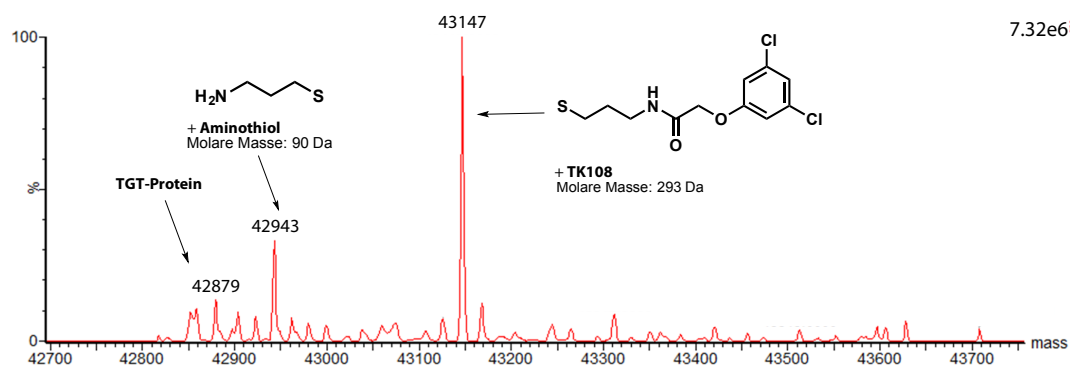
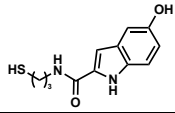
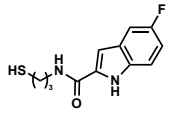
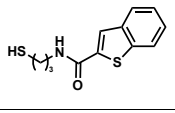
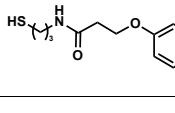
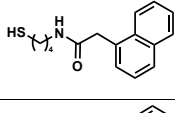
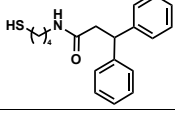
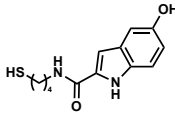
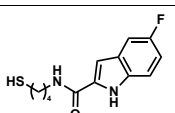
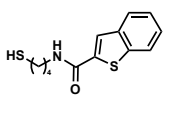
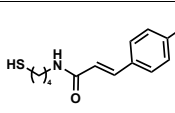


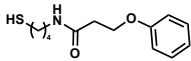
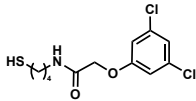
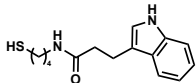
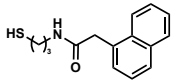
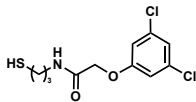
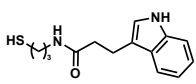
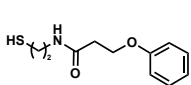
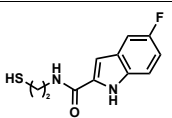
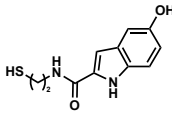
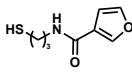
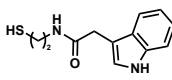
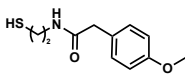
Abbildung 4.6 Exemplarisches Massenspektrometrie-Spektrum von TGT C158S/C281S/Y330C/H333A in Reaktion mit Fragment **TK108** unter Einfluss von DTT.

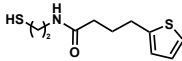
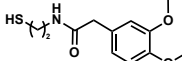
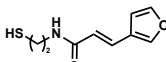
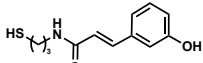
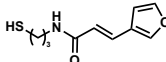
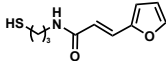
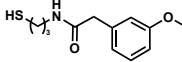
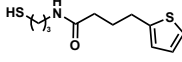
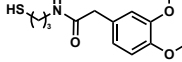
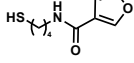
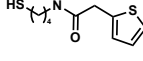
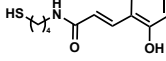
die mit dem eigentlichen Fragmentmolekül konkurriert und so das Gesamtergebnis beeinflussen kann. Abbildung 4.6 zeigt ein Massenspektrum der *Tethering*-Reaktion von TGT C158S/C281S/Y330C/H333A mit **TK108** unter Einfluss von DTT.

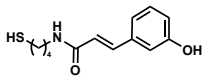
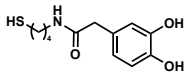
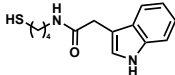
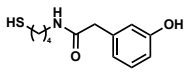
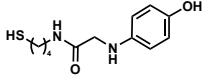
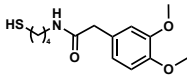
Die Ergebnisse des Screenings sind in Tabelle 4.1 mit der prozentualen Modifikation bzw. dem unveränderten Anteil der Proteine aufgeführt.

Tabelle 4.1 Ergebnisse des MS-Screenings der *Tethering*-Fragmente an TGT C158S/C281S/Y330C/H333A.

Verbindung	Spezies	Rate [%]	Struktur
TK094	TK094 Keine Modifikation Amin	9 49 42	
TK095	TK095 Keine Modifikation Amin	46 54 -	
TK096	TK096 Keine Modifikation Amin	31 33 36	
TK097	TK097 Keine Modifikation Amin	- 100 -	
TK098	TK098 Keine Modifikation Amin	35 65 -	
TK099	TK099 Keine Modifikation Amin	21 60 19	
TK100	TK100 Keine Modifikation Amin	- 100 -	
TK101	TK101 Keine Modifikation Amin	- 62 38	
TK0102	TK102 Keine Modifikation Amin	21 55 24	
TK103	TK103 Keine Modifikation Amin	16 84 -	

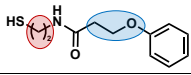
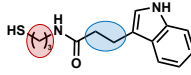
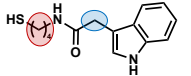
Verbindung	Spezies	Rate [%]	Struktur
TK104	TK104 Keine Modifikation Amin	- 100 -	
TK105	TK105 Keine Modifikation Amin	26 74 -	
TK106	TK106 Keine Modifikation Amin	17 83 -	
TK107	TK107 Keine Modifikation Amin	16 84 -	
TK108	TK108 Keine Modifikation Amin	70 7 23	
TK109	TK109 Keine Modifikation Amin	66 - 34	
TK110	TK110 Keine Modifikation Amin	46 43 11	
TK111	TK111 Keine Modifikation Amin	- 100 -	
TK112	TK112 Keine Modifikation Amin	- 100 -	
TK135	TK135 Keine Modifikation Amin	9 49 42	
TK136	TK136 Keine Modifikation Amin	- 62 38	
TK140	TK140 Keine Modifikation Amin	- 100 -	

Verbindung	Spezies	Rate [%]	Struktur
TK141	TK141 Keine Modifikation Amin	- 100 -	
TK142	TK142 Keine Modifikation Amin	12 76 12	
TK147	TK147 Keine Modifikation Amin	- 100 -	
TK148	TK148 Keine Modifikation Amin	17 83 -	
TK149	TK149 Keine Modifikation Amin	27 73 -	
TK157	TK157 Keine Modifikation Amin	33 49 18	
TK158	TK158 Keine Modifikation Amin	- 100 -	
TK162	TK162 Keine Modifikation Amin	- 100 -	
TK163	TK163 Keine Modifikation Amin	- 76 24	
TK164	TK164 Keine Modifikation Amin	47 53 -	
TK165	TK165 Keine Modifikation Amin	- 88 12	
TK169	TK169 Keine Modifikation Amin	35 65 -	

Verbindung	Spezies	Rate [%]	Struktur
TK170	TK170 Keine Modifikation Amin	- 91 9	
TK171	TK171 Keine Modifikation Amin	- 100 -	
TK173	TK173 Keine Modifikation Amin	- 100 -	
TK174	TK174 Keine Modifikation Amin	19 67 14	
TK175	TK175 Keine Modifikation Amin	- 57 43	
TK176	TK176 Keine Modifikation Amin	18 71 11	

Insgesamt kann die Affinität der einzeln gemessenen Fragmente bei der gewählten Reaktionsbedingung als gering eingeschätzt werden. Die besten Ergebnisse wurden mit Verbindungen **TK108** (70%) und **TK109** (66%) erzielt. Zusätzlich zum allgemeinen aromatischen Charakter der gesamten Fragmentbibliothek zeigt eine genauere Betrachtung beider Treffer-Moleküle gemeinsame Merkmale bestimmter Strukturelemente. So bildet ein Linker mit drei Methylengruppen zusammen mit einer Kettenlänge zwischen Fragment und Amidbindung von zwei Atomen ein einzigartiges Muster innerhalb der Bibliothek. Obwohl Substanzen mit vergleichbar langen Kettenabschnitten zwischen der reaktiven Thiolgruppe und dem Fragment in der Bibliothek vorliegen, wird durch die unterschiedliche Anzahl der Atome vor und nach der Amidgruppe die Position der Amidgruppe in der Gesamtheit zwischen Cysteinanker und

Tabelle 4.2 Exemplarische Beispiele von Fragmenten mit gleicher Kettenlänge zwischen dem reaktiven Cysteinrest und Fragment.

Verbindung	Linkerlänge	Länge zum Fragment	Rate [%]	Struktur
TK110	2	3	46	
TK109	3	2	66	
TK173	4	1	-	

Fragment beeinflusst. In Tabelle 4.2 sind exemplarische Variationen der Kettenlänge abgebildet. Dies kann auch einen strukturellen und thermodynamischen Einfluss auf die Stabilisierung des *Tethers* haben (siehe Abbildung 4.2). Wie bereits beschrieben, spielt die gesamte Länge zwischen Disulfidbrücke und Fragment eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung des Fragments gegenüber dem Zielprotein, so dass der Linker einen optimalen entropischen Beitrag zur Konjugationsstärke liefert.

In den zuvor ermittelten Ergebnissen aus der Masterarbeit des Autors wurde bereits die *Tether*-Bibliothek von DR. SASCHA BRASS (Arbeitsgruppe PROF. DR. GERHARD KLEBE, Philipps-Universität Marburg, Deutschland) auf das gleiche Zielprotein angewandt. Aus diesem Screening zeigte sich die besten Modifikationsraten mit den Fragmenten **SB102** (84%), **SB114** (81%) und **SB115** (73%) (Abbildung 4.7). Strukturell gibt es keine größeren Ähnlichkeiten in der chemischen Beschaffenheit der aufgefunden Substanzen. Allerdings konnte eine Kokristallisation der TGT-Mutante in Gegenwart von **SB102** unter zuvor gefundenen Kristallisationsbedingungen durchgeführt werden. Dennoch wurden lediglich der Raumgruppe $P6_522$ entsprechende symmetrische Kristalle erhalten, die das disulfidverbrückte "Dimer" beinhalten. Auch ein weitreichendes Screening nach zusätzlichen Kristallisationsbedingungen (1920 Bedingungen) am MARXTAL Kristallisationslabor (Marburg, Deutschland) zeigte die deutliche Präferenz zur Kristallisation in dieser Raumgruppe. Entweder scheint ein kleiner Rest des nicht umgesetzten Proteins zu kristallisieren oder unter den verwendeten Kristallisationsbedingungen spaltet sich die kovalente Disulfidbindung reversibel zwischen dem Cystein und dem Fragment.

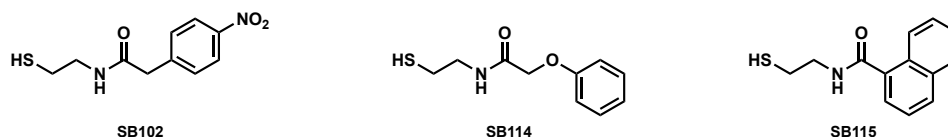
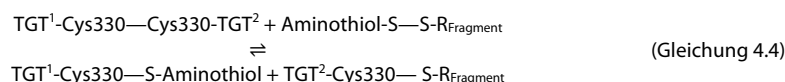
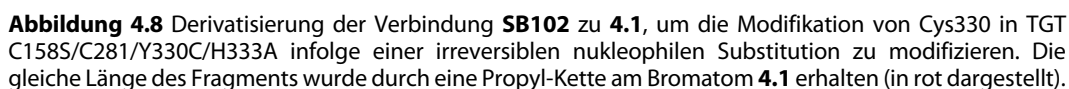


Abbildung 4.7 *Tether*-Fragmente aus der SB-*Tether*-Bibliothek mit den höchsten Modifikationsraten zum Zielprotein TGT S158C/S281C/Y330C/H333A. **SB102** (84%), **SB114** (81%) und **SB115** (73%).

Aus diesem Grund wurde ein aufwändiger Screen am MARXTAL mit den beiden *Tether*-Fragmenten **TK108** und **TK109** nicht weiterverfolgt, da im Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen aus der SB-Bibliothek niedrigere Modifikationsraten erzielt wurden. Insbesondere die Reversibilität der Disulfidbindung zum Fragment legt nahe, dass sie unter den Kristallisationsbedingungen aufgelöst wird, so dass das Monomer in einer Rückreaktion in der energetisch günstigen Anordnung als disulfidverbrücktes "Dimer" (TGT-Cys330—Cys330-TGT) in Lösung kristallisiert (siehe Gleichung 4.4).



Im Anschluss an das klassische Verfahren der *Tethering*-Methodik im Gleichgewicht durch Umlagerung der Disulfidspezies, wurde die Thiofunktion von **SB102** durch eine Brommethylgruppe ersetzt (**4.1**), um eine Modifikation des Cys330-Restes als Ergebnis der irreversiblen nukleophilen Substitution ("Alkylierung") zu erreichen. Die chemischen Eigenschaften von **SB102** bleiben weitestgehend erhalten, da nur die zu reagierende Gruppe ersetzt wird. Die gleiche Länge des Fragments ist weiterhin gegeben, indem die Alkylkette um eine Einheit verlängert wird, die zuvor vom reagierenden Thiol-Schwefel in **SB102** besetzt gewesen wäre (rot markiert in Abbildung 4.8).



Ähnlich zum *Tethering*-Protokoll wurde das Protein mit **4.1** zusammengegeben und anschließend mit Hilfe von Massenspektrometrie nach Abtrennung überschüssiger niedermolekularer Spezies analysiert. Die Reaktion wurde in Anwesenheit und Abwesenheit von DTT durchgeführt, jedoch keine positiven Effekte auf die Modifikationsrate durch DTT beobachtet. Es wird daher angenommen, dass DTT in der reduzierten Form selbst mit dem niedermolekularen Reagenz **4.1** als Ergebnis einer nukleophilen Reaktion reagiert und dadurch die Konzentration von **4.1** in Lösung abnimmt. Für weitere Untersuchungen wurde aus diesen Gründen die Verwendung von DTT verzichtet.

Um möglichst viele Faktoren wie Temperatur, Reaktionszeit und Ligandenkonzentration zu berücksichtigen, wurden diese Parameter variiert und untersucht. In Tabelle 4.3 sind die verwendeten Bedingungen zusammengefasst. Die Konzentration des Proteins, sowie des DMSO wurde hierbei konstant gehalten. Ersichtlich wird, dass die Modifikationsraten erst bei höheren Ligandenkonzentrationen, Reaktionszeiten und Temperaturen erzielt wurden. Dennoch wurden Unregelmäßigkeiten beobachtet, da in einigen Fällen bei höheren Äquivalenten des Liganden zum Protein keine bzw. geringere Modifikationsraten beobachtet werden konnten. Dabei war das unmodifizierte Protein ausnahmslos in der Lösung anzutreffen,

so dass von geringen Denaturierungsprozessen ausgegangen werden kann. Längere Reaktionszeiten und Temperaturen zeigen signifikante Erhöhungen der Modifikationsraten des Proteins, aber dennoch ergaben sich inkonsistente Ergebnisse innerhalb einzelner Temperatur- und Reaktionszeitreihen. Die Abhängigkeit zwischen Reaktionsbedingung und Modifikationsrate zeigen nur wenige Korrelationen zueinander und insbesondere die Reproduktion der Ergebnisse erwies sich als wenig stabil.

Tabelle 4.3 Verwendete Reaktionsbedingungen zur Proteinmodifikation von TGT S158C/S281C/Y330C/ H333A (20 μ M) mit Ligand **4.1** (10% DMSO).

#	Ligand [eq.]	T [°C]	t [h]	Rate [%]	#	Ligand [eq.]	T [°C]	t [h]	Rate [%]
1	20	rt	1	-	8	40	rt	3	-
2	40	rt	1	-	9	60	rt	3	9.6
3	60	rt	1	-	10	80	rt	3	8.0
4	20	rt	2	13.6	11	40	37	2	6.7
5	40	rt	2	46.6	12	60	37	2	62.9
6	60	rt	2	-	13	80	37	2	12.8
7	80	rt	2	-					

Eine genauere Analyse mittels ^1H -NMR des Liganden **4.1** etwa einen Monat nach Abschluss der Synthese, zeigte einen signifikanten Zerfall von etwa 50% des Liganden (Abbildung 4.9). In der Veröffentlichung von REDDY *ET AL.*^[140] konnte nachweislich die Herstellung von 5,6-Dihydro-4*H*-1,3-Oxazin Hydrobromid als Umlagerungsprodukt (U) durch nukleophile Autozyklo-*O*-Alkylierung von *N*-(3-Bromopropyl)amiden unter neutralen Bedingungen gezeigt werden. Abhängig von dem angefügten Fragment X am Amid wird die Effizienz der Autozyklisierung gesteuert. Elektronenziehende Gruppen wie die Nitrobenzolgruppe in **4.1**, verlang-

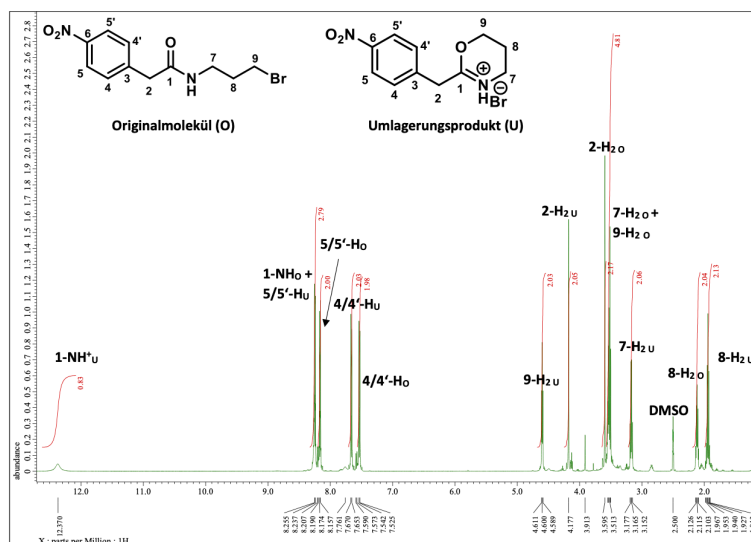


Abbildung 4.9 ^1H -NMR Zerfallsspektrum von Verbindung **4.1** nach ca. einem Monat nach Aufarbeitung des Synthesegemischs. Die Messung des niedermolekularen Moleküls **4.1** wurde in DMSO durchgeführt und die Zuordnung der Moleküle durch Beschriftung mit O (Originalmolekül) und U (Umlagerungsprodukt) deklariert.

samen den Zyklisierungsprozess. Die Verbindung reagiert aber dennoch über eine geraume Zeit, so dass die Konzentration des umzusetzenden Moleküls mit der Zeit abnimmt. Diese Faktoren deuten darauf hin, dass Verbindung **4.1** eine ungeeignete Struktur für die Modifikation des Proteins darstellt, da der Ligand mit der Zeit, insbesondere im zeitaufwändigen Kristallisationsprozess, abgebaut werden würde.

In einem neuen Ansatz wurde versucht, die irreversible Modifikation von Cys330 mit neuen reaktiven Gruppen unabhängig von den *Tethering*-Ergebnissen zu adressieren. Im Allgemeinen sind Maleimide nach wie vor die Reagenzien der Wahl für die Herstellung von Protein-konjugaten. Trotz der bekannten Instabilitäten der resultierenden Produkte, die mit *in vivo*-Thiol-Austauschreaktionen verbunden sind, profitieren sie von der schnellen Reaktionskinetik unter wässrigen Bedingungen, der einfachen Synthese modifizierter Maleimid-Reagenzien und der Tatsache, dass keine komplexe Gentechnik des Proteintargets erforderlich ist. Inzwischen ist jedoch gut dokumentiert, dass die gebildeten Thiol-Succinimidyl-Konjugate schnelle Austauschreaktionen mit im Plasma vorhandenen Thiolen eingehen und so zur Freisetzung vom Maleimid führen.^[141–143] Alternativ wird in der Veröffentlichung von BERNADIM *ET AL.* über die Verwendung von modifizierten Acrylverbindungen für die chemoselektive Cystein-Biokonjugation berichtet.^[144] Sie werden als cysteinselektive Verbindungen mit schneller Reaktionskinetik unter milden Bedingungen (pH 8.0) beschrieben und zeichnen sich durch stabile Konjugate und einfache Synthese der Verbindungen aus. Ein zusätzlicher Vorteil gegenüber Maleimiden ist die Vermeidung von Kreuzreaktionen mit Lysinen, die sonst normalerweise unter leicht basischen Bedingungen auftreten. Durch rationales Design entworfene Acrylverbindungen können unter biokompatiblen Bedingungen in einer Thiol-Michael-Addition mit nahezu stöchiometrischer Umsetzung durchgeführt werden.

Insbesondere Verbindung **4.2** aus dieser Veröffentlichung erwies sich als ein sehr wirksames Reagenz, weshalb in Kooperation mit LUKAS HEYDER diese Verbindung zuerst hergestellt wurde. Bereits in den ersten Ansätzen konnte die Proteinvariante der TGT bei 20 eq. Überschuss des Liganden, bei Raumtemperatur und zwei Stunden Reaktionszeit mit Hilfe der

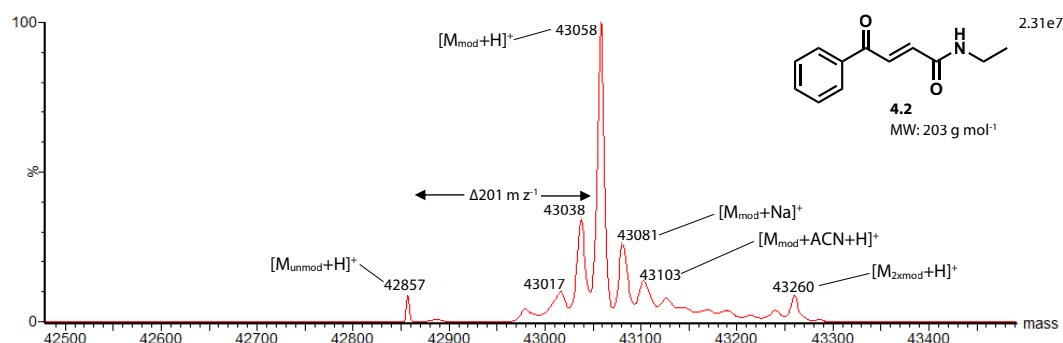


Abbildung 4.10 ESI-Massenspektrum aus dem gereinigten Reaktionsgemisch aus TGT C158S/C281S/Y330C/H333A (20 μ M) mit 20 eq. **4.2** bei Raumtemperatur und zwei Stunden Reaktionszeit.

Verbindung **4.2** (in DMF) fast vollständig modifiziert werden. Teilweise konnte die Variante $[M_{2xmod}+H]^+$ identifiziert werden konnte, was auf die Modifikation eines weiteren proteinogenen Restes hindeutet. Abbildung 4.10 zeigt die überwiegende Präsenz der modifizierten Proteinspezies mit $4.2 [M_{mod}+H]^+$ im Massenspektrum. Weitere modifizierte Varianten wie das Natrium-Addukt bzw. Acetonitril-Addukt können aus dem Spektrum entnommen werden. Weiterhin lassen sich Abspaltprodukte des modifizierten Komplexes (43038 und 43017 m z^{-1}) nachweisen. Eine weitere Erhöhung der Ligandenkonzentration führte ausschließlich zur Erhöhung der Intensität von $[M_{2xmod}+H]^+$. Die folgenden Kristallisationsansätze wurden mit 20 eq. Überschuss des Liganden **4.2** verfolgt.

Zunächst wurde unter bekannten Wildtyp-TGT-Kristallisationsbedingungen (pH 5.5 bzw. pH 8.5, 13% PEG8000, 10% DMSO) versucht, die chemisch modifizierte Proteinvariante zu kristallisieren. Unter diesen Bedingungen konnten lediglich nadelförmige oder sehr kleine Kristalle erhalten werden. Dies zeigte aber auch, dass die Kristallisation der modifizierten Proteinvariante generell möglich ist. Insgesamt wurde die Kristallform mit der $P6_522$ -Raumgruppe nicht mehr beobachtet, so dass eine Kristallisation der disulfidverbrückten Variante als unwahrscheinlich angesehen wurde. In Folge eines Screenings am MARXTAL (Marburg, Deutschland) wurden 1344 verschiedene Kristallisationsbedingungen durchleuchtet und in insgesamt vier vielversprechenden Bedingungen einer plättchenartige Kristallformen bei 8 mg mL^{-1} Protein gefunden (Tabelle 4.4). Andere Bedingungen wiesen dagegen vermehrt Kristalle in der $P6_522$ -Raumgruppe auf, was auf restliches unmodifiziertes Protein hinweist.

Tabelle 4.4 Neuartige Kristallisationsbedingungen zur Kristallisation der modifizierten Proteinvariante S158C/S281C/Y330C/H333A mit **4.2** bei 8 mg mL^{-1} bei 18°C .

#	Kristallisationsbedingung
1	0.2 M tri-Kaliumcitrat, 20% w/v PEG3350
2	0.2 M tri-Lithiumcitrat, 20% w/v PEG3350
3	0.1 M TRIS pH 8.5, 20% w/v PEG3350
4	0.2 M Kaliumthiocyanat, 20% w/v PEG2000

Bei der Reproduktion aller vier Kristallisationsbedingungen erwies sich nur Bedingung #3 als zufriedenstellend und in weiteren Optimierungsphasen wurde einzig diese weiterverfolgt. Insgesamt konnte durch eine Erniedrigung der Konzentration des Fällungsmittels und der Proteinkonzentration gut streuende Kristalle erhalten werden. Eine Vermessung eines Kristalls am Teilchenbeschleuniger BESSY II (Helmholtz-Zentrum Berlin, Deutschland) wies eine Packung in der Raumgruppe $C2$ nach. Dies entspricht der gleichen Raumgruppe in der auch die Wildtyp-Struktur kristallisiert. Ein genauerer Blick auf die Struktur zeigte dementsprechend die typische Dimeranordnung, die normalerweise von dem Homodimer der TGT eingenommen wird (Abbildung 4.11a). Wie erwartet, ist der Ligand **4.2** kovalent an Cys330 mit einer 78%igen Besetzung gebunden, charakterisiert über eine gut definierten Elektronendichte. Nur

am Phenylring ist eine Unterbrechung der Elektronendichte (Abbildung 4.11b) zu erkennen, obwohl die Orientierung des Ringes dennoch klar definiert ist und in einer Ebene mit der Carbonylgruppe liegt.

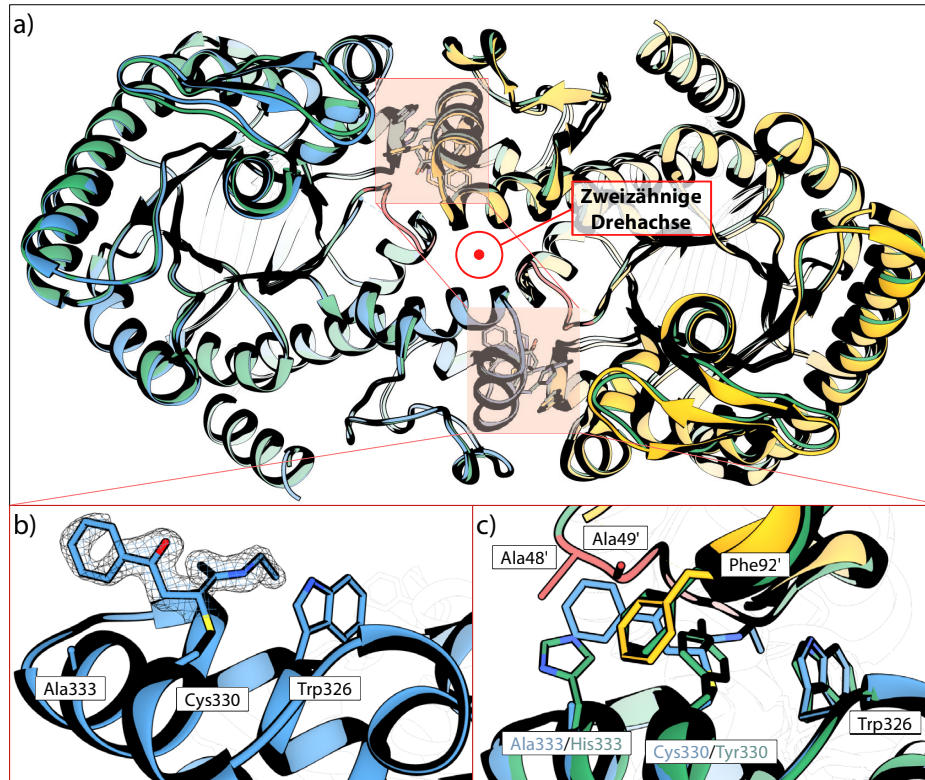


Abbildung 4.11 a) Darstellung der überlagerten *Z. mobilis* Strukturen TGT-Wildtyp (C_{grün}, PDB Code: 1PUD)^[32] und der modifizierten TGT-Variante C158S/C281S/Y330C/H333A mit **4.2** (C_{blau+gelb}, PDB Code: 6YGV) als Bändermodell. Die $\beta 1\alpha 1$ -Schleife ist in der Wildtyp-Struktur rot dargestellt. b) Bindungsmodus von **4.2** (C_{blau}, 1.63 Å Auflösung, PDB Code: 6YGV) an der Position Cys330 am ehemaligen aromatischen Cluster. 2mF_o-DF_c ist auf dem Liganden dargestellt (blau, Konturstufe 1.0 σ). c) Detaillierte Darstellung der Dimer-Grenzfläche am aromatischen Cluster. Die Farben entsprechen der gleichen Beschreibung wie in a). Atom-Farbcode: O = rot, N = blau, S = gelb.

Am aromatischen Cluster nimmt der Ligand **4.2** keinen Einfluss auf die restliche Orientierung der aromatischen Aminosäuren, so dass Trp326 kaum betroffen ist und Phe92' lediglich um etwa 0.5 Å vom Liganden weg verschoben ist. Einzig wird das Schleifen-Helix-Motiv durch die Einbringung des kovalenten Liganden **4.2** beeinträchtigt. Eine Überlagerung der modifizierten Proteinmutante mit dem Wildtyp Protein zeigt einen nahen Kontakt zwischen dem Phenylring von Ligand **4.2** mit der Seitenkette von Ala49' (~1 Å) und Ala48' (~3.3 Å). Aufgrund der sterischen Wechselwirkungen wird infolgedessen der Schleifenbereich destabilisiert und liegt in der Kristallstruktur ungeordnet vor. Bereits bekannt aus anderen Projekten (**Kapitel 2** und **5**) führt die Destabilisierung des gesamten Schleifen-Helix-Motivs (Thr47 – Thr62) zur Änderung der Anordnung des Dimers infolge einer leichten Verkipfung eines Monomers

gegenüber dem anderen um mehrere Ångström und spiegelt sich zudem in einer Verkürzung der α -Achse der Einheitszelle um ca. 6 Å wider. Die kovalente Modifikation beeinträchtigt in diesem Fall nur die $\beta 1\alpha 1$ -Schleife des Schleifen-Helix-Motivs, wodurch die Aminosäuren 48 – 53 nicht in der Elektronendichte aufgelöst werden. In der Gesamtheit der Dimer-Struktur gibt es keinen Unterschied zur Wildtyp-Struktur mit Ausnahme der nicht-aufgelösten $\beta 1\alpha 1$ -Schleife. Es wird daher angenommen, dass nur die vollständige Destabilisierung des Schleifen-Helix-Motivs die Störung der Dimeranordnung erzwingen kann. Im vorliegenden Fall stabilisiert der Ligand möglicherweise den nativen Zustand des Dimers. Auf der anderen Seite wäre es möglich, dass die C2-Raumgruppe trotz der kovalenten Modifikation und der nur geringen Destabilisierungseffekte des Liganden **4.2** immer noch die energetisch günstigste Packung des Dimers erlaubt.

In einem weiteren Prozess wurden zwei weitere Liganden auf der Basis von **4.2** entworfen und hergestellt. Sie unterscheiden sich chemisch dadurch, dass sie anstelle der Ethylgruppe am Amid eine Adamantyl- (**4.3**) oder Naphthylmethylgruppe (**4.4**) tragen (Abbildung 4.12), um in dieser Position den sterischen Raumbedarf zu erhöhen und so eine Monomerisierung zu forcieren, da der Ligand **4.2** nur mit seiner Phenylgruppe die $\beta 1\alpha 1$ -Schleife beeinflusst. Aufgrund seines geringen Volumens und seiner einfachen Struktur befindet sich die terminale Ethylengruppe zwar inmitten der Grenzfläche, hat aber keinen Einfluss auf die umgebenden Strukturelemente. Eine Vergrößerung zum Adamantyl- bzw. Naphthylmethylrest sollte strukturell im sterischen Konflikt mit der α -Helix 1 kommen und könnte aufgrund dessen das gesamte Schleifen-Helix-Motiv so stark stören, dass nur die Kristallisierung der Monomere als Möglichkeit verbleibt.

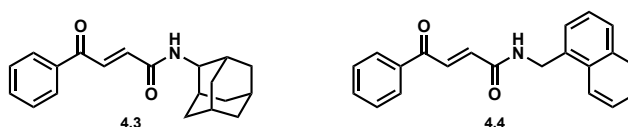


Abbildung 4.12 Nachfolge Verbindungen von **4.2** zur kovalenten Modifikation an Cys330 in der TGT-Variante C158S/C281S/Y330C/H333A.

Zunächst wurden die gleichen Bedingungen für die Modifikation mit **4.2** getestet (Raumtemperatur und zwei Stunden Reaktionszeit) und dabei unterschiedliche Konzentrationen des Liganden untersucht. Die Verwendung zwischen 5 und 60 eq. Ligand erreichte in beiden Fällen lediglich Modifikationsraten zwischen 10 und 25%. Der erhöhte sterische Bedarf der Liganden wirkt sich offensichtlich negativ auf die kovalente Modifikation von Cys330 aus, zumal in Lösung diese Variante wahrscheinlich zum großen Teil mit Disulfidbrücke als reversibles kovalentes "Dimer" vorliegt. Die reine Mutante TGT Y330C weist in Lösung einen kovalenten "Dimer"-Anteil von 73% auf.^[38] Umso erstaunlicher ist die Modifikationsrate von **4.2**, die nahezu vollständig abläuft. Um eine mögliche Disulfidbildung von Cys330 zu Cys330' zu

verhindern, wurden während der anschließenden Reaktionen Reduktionsmittel in Form von DTT und TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin) zugegeben. Erstaunlicherweise konnte alleine mit Zugabe von TCEP die Ausbeute des modifizierten Proteins beinahe verdoppelt (35 – 42%, siehe Abschnitt 4.8.3) werden und zeigt, dass die verbrückende Disulfidbindung die Additionsreaktion der Liganden erschwert. Im Gegensatz dazu wirkt DTT gegenläufig, indem die Modifikationsrate reduziert wird. Vermutlich reagiert DTT mit dem Acrylamid, anstatt dass die reduzierenden Eigenschaften auf die Disulfidbindungen wirken, so dass insgesamt die Konzentration der Liganden verringert wird. Weiterhin kann angenommen werden, dass die Reaktivität der entworfenen Liganden mit dem angefügten Fragment abnehmen, da der Referenzligand **4.2** die Reaktion ohne die Verwendung von Reduktionsmitteln problemlos eingeht. Höchstwahrscheinlich macht die zunehmende sterische Behinderung der Liganden es schwieriger, den vergrabenen Cysteinrest zu adressieren. Zuletzt wurde versucht durch erhöhte Temperatur bei 37 °C oder bei unveränderter Raumtemperatur aber erhöhter Reaktionszeit von 24 Stunden die Reaktionsbedingung zu optimieren. Die Bedingungen erschienen jedoch zu harsch, da weder das modifizierte Protein noch das Ausgangsprotein in der anschließenden massenspektrometrischen Analyse gefunden werden konnten. In Tabelle 4.5 sind alle durchvariierten Reaktionsbedingungen mit **4.3** und **4.4** aufgeführt.

Tabelle 4.5 Verwendete Reaktionsbedingungen zur Proteinmodifikation von TGT S158C/S281C/Y330C/H333A (20 µM) mit Ligand **4.3** und **4.4** (10% DMF).

4.3					4.4				
#	Ligand [eq.]	T [°C]	t [h]	Rate [%]	#	Ligand [eq.]	T [°C]	t [h]	Rate [%]
1	5	rt	2	9	1	5	rt	2	20
2	10	rt	2	22	2	10	rt	2	13
3	20	rt	2	15	3	20	rt	2	16
4	40	rt	2	16	4	40	rt	2	17
5	60	rt	2	25	5	60	rt	2	16
6	30 + 2 mM DTT	rt	2	19	6	30 + 2 mM DTT	rt	2	9
7	30 + 0.2 mM TCEP	rt	2	42	7	30 + 0.2 mM TCEP	rt	2	35
8	30 + 0.2 mM TCEP	rt	24	-	8	30 + 0.2 mM TCEP	rt	24	-
9	30 + 0.2 mM TCEP	37	24	-	9	30 + 0.2 mM TCEP	37	24	-

4.5 Zusammenfassung

Klassisches Disulfid-*Tethering* wurde mit der hauseigenen Bibliothek von 40 Verbindungen auf das Zielprotein TGT S158C/S281C/Y330C/H333A angewandt. Zusätzlich zu den Ergebnissen aus der Masterarbeit des Autors wurden somit insgesamt 70 Verbindungen diesem Prozess unterworfen und analysiert. Das beobachtete Reaktionsverhalten aller verwendeten *Tethering*-Moleküle wies eine geringe Modifikationsrate zum Zielprotein auf. Lediglich fünf Fragmente zeigten in der massenspektrometrischen Analyse eine höhere Affinität (>70%) zum Zielprotein. Entweder spaltet sich die reversible kovalente Disulfidbindung zwischen dem Cystein und dem

Fragment während der Kristallisation, oder ein kleiner Rest des unmodifizierten Proteins kristallisiert bevorzugt in Lösung aus. Daher stellt das klassische Disulfid-*Tethering* eine ungünstige Methode zur Modifizierung der proteineigenen Cysteinresten dar, die sowohl in Lösung als auch bei der Kristallisation an der Bildung stabiler kovalent-reversible "Dimere" beteiligt sind.

Ein weiterer Ansatz unter Einsatz einer anderen reaktiven Gruppe an Stelle des Thiols mit einem Bromoalkylrest (**4.1**) war in diesem Fall ebenfalls unvorteilhaft. Die Kombination aus einer endständigen Bromopropylgruppe in räumlicher Nähe zu einer Amidgruppe führt über einen längeren Zeitraum zur Autozyklisierung des Fragments und verringerte so die Konzentration des Liganden. Insbesondere im langwierigen Kristallisationsprozess stellt dies eine große Herausforderung dar. Dennoch funktioniert im Allgemeinen diese Vorgehensweise, da Modifikationsraten von bis zu 60% erreicht wurden, auch wenn die Reproduktionen der einzelnen Ergebnisse ein Problem darstellt.

Deutlich vielversprechender war die Nutzung von Acrylamiden, die in der Publikation von BERNARDIM ET AL. vorgestellt wurden.^[144] Aufbauend auf **4.2**, das bereits in der Publikation oberflächenexponierte Cysteinreste von Annexin V, C2Am und Albumin unter milden Bedingungen (Raumtemperatur, pH 8 und kurze Reaktionszeiten von weniger als 2 Stunden) fast vollständig modifiziert, zeigte dieser Ligand diese Eigenschaften ebenfalls in der Anwendung an der TGT-Variante. Somit konnte gezeigt werden, dass die Modifikation eines an der Disulfidbindung beteiligten Cysteins zu einem Homodimer ohne Reduktionsmittel möglich ist. Die röntgenkristallographische Analyse zeigte allerdings nur einen schwachen Einfluss auf die Dimer-Grenzfläche, der sich geringfügig auf die Destabilisierung der $\beta 1 \alpha 1$ -Schleife mit seiner Phenylgruppe beschränkt. Modifikationen durch das Anbringen von sterisch anspruchsvolleren Resten am Amid würden dagegen die α -Helix 1 durch einen direkten sterischen Konflikt destabilisieren und die Bildung der Wasserstoffbrücke zwischen Trp326 und Met93' verhindern. Die Erweiterung des Liganden **4.2** auf **4.3** und **4.4** erwies sich bei der Modifikation der Proteinvariante als schwieriger, aber dennoch tendenziell möglich. Insbesondere das Reduzierungsmittel TCEP erwies sich als wichtig in der Umsetzung mit Cys330. Vermutlich wird das Cystein bei der Reaktion mit den sterisch anspruchsvolleren Liganden **4.3** und **4.4** lösungsmittel exponiert benötigt und eine Abschirmung dieses Restes in Form einer Disulfidbrücke des reversiblen "Dimers" muss verhindert werden.

Die möglichst vollständige Modifikation von Cys330 durch **4.3** und **4.4** stellt eine vielversprechende Option für die Monomerisierung dar, die aufgrund langwieriger Optimierungsprozesse im Rahmen der Doktorarbeit nicht fertig gestellt werden konnte. Weiterhin wäre die Einführung einer Propagylgruppe am Acrylamid eine Möglichkeit nach der kovalenten Modifikation nachträglich die Ligandenstruktur zu erweitern unter Verwendung einer Click-

Reaktion mit einem Azid. Da die Propargylgruppe nicht viel größer als der Ethylrest in **4.2** ist, könnte dieser Ligand ähnliche Reaktivität wie **4.2** besitzen. Über die Azid-Komponente wäre eine deutliche Erhöhung des Raumbedarfs eines angefügten Liganden am Zielcystein zu erreichen, um so die Bildung des nicht-kovalenten Dimers zu verhindern. Anders herum wäre es auch möglich, eine Azidgruppe am Liganden einzufügen, die nach erfolgreicher Bindung an das Protein mit Alkinstrukturen über die Click-Reaktion zu modifizieren wären (Abbildung 4.13).^[145]

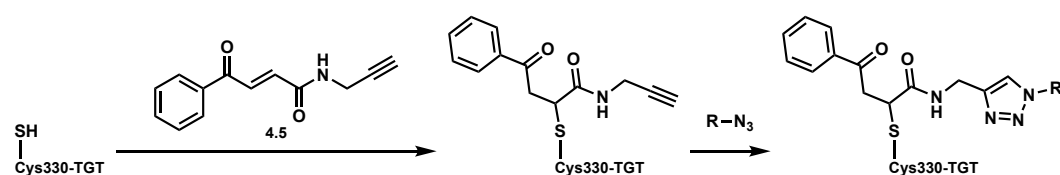


Abbildung 4.13 Schematische Darstellung einer Cycloadditions-Reaktion an Cys330 in der TGT-Variante C158S/C281S/Y330C/H333A. Eine propargylmodifizierte Struktur **4.5** (basierend auf **4.2**) wird zunächst an Cys330 in Folge einer Additionsreaktion kovalent gebunden. Nach erfolgreicher Modifikation dient die Alkingruppe als reaktive Gruppe für die Umsetzung mit verschiedenen räumlich sperrigen Azidverbindungen zu einem stabilen Triazol.

4.6 Methoden

Die verwendeten Materialien, Chemikalien, Laborgeräte und Puffer sind in **Kapitel 6** aufgeführt. Allgemeine Methoden, sofern nicht in diesem Kapitel erwähnt, werden ebenfalls in **Kapitel 6** beschrieben.

4.6.1 Gezielte Mutagenese durch PCR

Die Klonierung bzw. Mutationen an TGT C158S/C281S/Y330C/H333A wurden von TRAN XUAN PHONG NGUYEN durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4.6.2 Proteinexpression und Reinigung von TGT C158S/C281S/Y330C/H333A

Zunächst wurden Zellen in einer Vorkultur (200 mL, LB-Medium, 0.1% (v/v) Ampicillin, 37 °C, 140 rpm) über Nacht angezüchtet, 25 mL dieser Vorkultur in eine Hauptkultur (2 L, LB-Medium, 0.1% (v/v) Ampicillin, 37 °C, 140 rpm) überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 inkubiert. Die Kultur wurde anschließend für eine Stunde auf 17 °C gekühlt, bevor die Überexpression nach Induktion mittels IPTG bei einer Endkonzentration von 1 mM bei 17 °C und 140 rpm über Nacht folgte. Das LB-Medium wurde durch Zentrifugation (10000 rpm, 4 °C, 10 min; *Avanti J-25*, BECKMAN COULTER) entfernt und das gewonnene Zellpellet in Lysepuffer (25 mL pro 1 L Hauptkultur) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (4 x 4 min, 4 °C, *Duty Cycle* 30%, *Output Control* 7; *Sonifiere 250*, BRANSON). Zur Trennung der unlöslichen Bestandteile wurde die Suspension zentrifugiert (20000 rpm, 4 °C, 60 min; *Avanti J-25*, BECKMAN COULTER) und das Lysat entnommen.

Die säulenchromatographische Reinigung (*ÄKTA_{prime} plus/ÄKTA_{FPLC}*; AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) erfolgte über zwei Schritte. Zunächst wurde das Lysat auf einen Anionenaustauscher (Puffer A äquilibriert; *Highload Q-Sepharose™*, GE HEALTHCARE) mit einer Geschwindigkeit von 3.5 mL min⁻¹ aufgetragen. Darauf folgend wurde ein Waschschritt mit Puffer A durchgeführt und das Protein mit anschließender fraktionierter Elution mit einem Gradienten von 0% – 40% Puffer B gegen Puffer A vorgereinigt erhalten. Mittels SDS-PAGE identifizierte TGT-enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und auf die *Strep-Tactin®XT-Superflow* Säule (Puffer W2 äquilibriert; IBA) mit einer Geschwindigkeit von 2.0 mL min⁻¹ aufgetragen. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen von Nukleinsäuren wurde ein Waschschritt mit Puffer W1 (zehnfaches Säulenvolumen) durchgeführt und anschließend wieder mit Puffer W2 solange äquilibriert, bis der Leitfähigkeitssensor eine gleichmäßige Basislinie aufwies. Adsorbiertes Protein wurde mit Puffer E2 bis zum erneuten Erreichen der Basislinie eluiert. Zur Entfernung von in Puffer E2 enthaltenem Biotin wurden die Fraktionen mit Hilfe eines Konzentrators (*Vivaspin* 30 kDa; 3500 rpm, 4 °C, *Multifuge 3SR*, HERAEUS) auf Puffer W2 äquilibriert.

Der *Strep-tag^{®II}* wurde mittels Thrombin (*Thrombin Cleavage Capture Kit*, NOVAGENE[®]) abgetrennt. Hierzu wurde nach Herstellerangaben Proteinlösung und Thrombin für 18 h bei Raumtemperatur inkubiert, das biotinylierte Thrombin, sowie der abgespaltene *Strep-tag^{®II}* durch Zugabe von Streptavidin-Agarose gebunden und durch Filtration (je 500 g, 4 °C, 1 min; 1-14K, SIGMA) abgetrennt. Die aufgearbeitete Proteinlösung wurde zur gewünschten Konzentration eingengt und nach Schockfrierung bei –80 °C aufbewahrt.

4.6.3 Tethering-Experimente

Zur Anbindung von Fragmenten über eine Disulfidbildung an das Zielprotein TGT S158C/S281C/Y330C/H333A, wurden Disulfid-Verbindungen genutzt, welche von T. KRONENBERGER (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gerhard Klebe, Philipps-Universität Marburg, Deutschland) bereitgestellt wurden. Modifikationen über nukleophile Substitution von Verbindung **4.1** bzw. Additionsreaktionen mit Verbindungen **4.2** – **4.4** wurden von L. HEYDER (Arbeitsgruppe PROF. DR. WIBKE DIEDERICH, Philipps-Universität Marburg, Deutschland) hergestellt. Sämtliche Moleküle der Disulfid-Klasse, sowie **4.1** wurden entsprechend der Zielkonzentration in DMSO und Acrylamide **4.2** – **4.4** in DMF gelöst.

Disulfid-Austausch-Screening

Basierend auf bestehenden Ergebnissen, gibt Tabelle 4.6 das Protokoll des Fragment-Screenings wieder. Hierzu wurden alle Komponenten in Puffer W2 zusammengegeben und die Reaktion für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Probenlösung durch Größenausschluss-Chromatographie (*Illustra[™] AutoSeq[™] G-50 Dye Terminator*, GE HEALTHCARE) nach Herstellerangaben gereinigt wurde, um Nebenreaktionen durch überschüssige Substrate zu verhindern. Die verwendeten Disulfid-*Tether*-Fragmente sind in Abbildung S 4.1 abgebildet. Mittels Massenspektrometrie wurde die Reaktionskontrolle durch die Serviceabteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg (DR. UWE LINNE, Abschnitt 6.8.4) überprüft.

Tabelle 4.6 Zusammensetzung der Protein-Ligand-Lösung zur Modifikation am Cys330 mit Disulfid-Verbindungen.

Komponenten	c [μM]
TGT S158C/S281C/Y330C/H333A	15
<i>Tethering</i> -Fragment	200
DTT	500

Bromoalkylamid zur Proteinmodifikation am Cystein

Die irreversible Proteinmodifikation mittels einer Substitutionsreaktion durch das Schwefelatom der Cysteingruppe an dem Bromoalkylamid wurde mit der Verbindung **4.1** durchgeführt. Tabelle 4.7 gibt die folgenden Reaktionsbedingungen wieder, die innerhalb des Screenings am

Protein durchgeführt wurden. Die Proteinkonzentration wurde in allen Versuchen konstant bei 20 μM gehalten, während die Ligandenkonzentration, Temperatur, Reduktionsmittel und Zeit variiert wurden. Reaktionen wurden in Puffer W2 nach Tabelle 4.7 zusammengegeben, inkubiert und anschließend die Probenlösung durch Größenausschluss-Chromatographie (*Illustra™ AutoSeq™ G-50 Dye Terminator*, GE HEALTHCARE) nach Herstellerangaben gereinigt.

Tabelle 4.7 Verwendete Reaktionsbedingungen von TGT S158C/S281C/Y330C/H333A (20 μM) mit **4.1**.

Ligand [μM]	eq.	DTT [μM]	eq.	T [$^{\circ}\text{C}$]	t [h]
400	20	-	-	rt	1
400	20	800	40	rt	1
400	20	-	-	rt	2
800	40	-	-	rt	1
800	40	-	-	rt	2
800	40	-	-	rt	3
800	40	-	-	37	2
1200	60	-	-	rt	1
1200	60	-	-	rt	2
1200	60	-	-	rt	3
1200	60	-	-	37	2
1600	80	-	-	rt	2
1600	80	-	-	rt	3
1600	80	-	-	37	2

Cystein-selektive Proteinmodifikation unter Verwendung von Acrylamide

Die irreversible Proteinmodifikation infolge einer Additionsreaktion des Cys330 Restes in der TGT-Variante S158C/S281C/Y330C/H333A an Acrylamid wurde beginnend mit **4.2** durchgeführt. Reaktionen mit Acrylamiden **4.3** und **4.4** basieren auf den Ergebnissen von **4.4**.

Tabelle 4.8 Verwendete Reaktionsbedingungen von TGT S158C/S281C/Y330C/H333A (20 μM) mit **4.2**.

Ligand [μM]	eq.	T [$^{\circ}\text{C}$]	t [h]
400	20	rt	2
500	25	rt	2
600	30	rt	2
700	35	rt	2

Tabelle 4.9 Verwendete Reaktionsbedingungen von TGT S158C/S281C/Y330C/H333A (20 μM) mit **4.3** und **4.4**.

4.3						4.4					
DTT/TCEP						DTT/TCEP					
[μM]	[eq.]	[μM]	[eq.]	T [$^{\circ}\text{C}$]	t [h]	[μM]	[eq.]	[μM]	[eq.]	T [$^{\circ}\text{C}$]	t [h]
100	5	-	-	rt	2	100	5	-	-	rt	2
200	10	-	-	rt	2	200	10	-	-	rt	2
400	20	-	-	rt	2	400	20	-	-	rt	2
800	40	-	-	rt	2	800	40	-	-	rt	2
1600	60	-	-	rt	2	1600	60	-	-	rt	2
600	30	2000	100	rt	2	600	30	2000	100	rt	2
600	30	200	10	rt	2	600	30	200	10	rt	2
600	30	200	10	rt	24	600	30	200	10	rt	24
600	30	200	10	37	24	600	30	200	10	37	24

Reaktionen wurde in Puffer W2 nach Tabelle 4.8 und Tabelle 4.9 zusammengegeben, inkubiert und anschließend die Probenlösung durch Größenausschluss-Chromatographie (*Illustra™ AutoSeq™ G-50 Dye Terminator*, GE HEALTHCARE) nach Herstellerangaben gereinigt.

4.6.4 Screening von Kristallisationsbedingungen am MarXtal

Um geeignete Kristallisationsbedingungen mit Protein-Ligand-Gemischen zu untersuchen, wurde ein automatisierter Kristallisations-Screen (*Honeybee 963™*, DIGILAB) von R. PÖSCHKE vom MARXTAL Kristallisationslabor (Marburg, Deutschland) mit 1344 Bedingungen in den aufgeführten Screening-Kits der Firma QIAGEN durchgeführt.

Tabelle 4.10 Getestete Kits zur Kristallisation der Firma QIAGEN am MARXTAL.

Kit	Präzipitant
<i>Classics Suite</i>	Salze, langkettiges PEG
<i>JCSG Core Suite I</i>	versch. PEG, Alkohole, Ammoniumsulfat
<i>JCSG Core Suite II</i>	versch. PEG, Alkohole, Ammoniumsulfat
<i>JCSG Core Suite III</i>	versch. PEG, Alkohole, Ammoniumsulfat
<i>JCSG Core Suite IV</i>	versch. PEG, Alkohole, Ammoniumsulfat
<i>JCSG+ Suite</i>	versch. PEG, Alkohole
<i>PACT Suite</i>	PEG1500, PEG3350, PEG6000

Die Ansätze wurden nach der *sitting-drop*-Methode mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an Protein von 4 und 8 mg L⁻¹ mit 20 eq. an Liganden getestet. Das Volumen der Kristallisationslösung im Reservoir betrug 80 µL. Der sitzende Tropfen wurde mit 300 nL der Proteinlösung und zum gleichen Volumenanteil an Kristallisationslösung vorgelegt. Die Kristallisationsansätze wurden bei 4 °C durchgeführt und im Anschluss die Kristallisationsplatten bei 18 °C aufbewahrt. In regelmäßigen Abständen wurden die Kristallisationstropfen visuell mit Hilfe eines Dokumentationssystems (*Rock Imager™*, FORMULATRIX) auf das Vorhandensein von Kristallen untersucht.

4.6.5 Kokristallisation von TGT C158S/C281S/Y330C/H333A mit 4.2

Kristalle wurden unter der Verwendung der *Hanging-Drop Vapour Diffusion*-Methode innerhalb von zwei bis drei Wochen bei 18 °C erhalten. Dazu wurde Ligand (in DMF) und Protein (9 mg mL⁻¹ in Puffer W2) miteinander vermischt. Die erhaltene Proteinlösung (10% DMF) mit einer zu untersuchenden Konzentration von 4.2 mM Ligand wurde im gleichen Anteil an Volumen des Kristallisationspuffers (100 mM TRIS pH 8.5, 20% (w/v) PEG3350) vermischt und auf ein Deckglas überführt. Gegebenenfalls konnte durch leichte Variation des Volumenverhältnisses zwischen Reservoir und Protein/Ligand zueinander die Kristallqualität optimiert werden. Weitere Verbesserungen konnten in Kombination durch Erniedrigung der Protein- oder PEG3350-Konzentration weiterhin erzielt werden. Reservoirvertiefungen

wurden mit 650 µL des Kristallisationspuffers befüllt und die Deckgläser mit Hilfe von Silikonfett versiegelt.

4.6.6 Datensammlung und Prozessierung

Der Datensatz der Kristallstruktur (Tabelle S 4.1) wurde am Elektronenspeicherring BESSY II (Helmholtz-Zentrum Berlin, Deutschland) an der *Beamline* 14.1 mit einem DECTRIS *Pilatus 6M* Detektor bei einer Wellenlänge von 0.9184 Å und 100 K aufgenommen. Vor der Datenerfassung wurde der Kristall für einige Sekunden in den Cryo-Puffer B überführt und im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Erhaltene Diffraktionsbilder wurden mit Hilfe von *XDS*^[79] indiziert, prozessiert und skaliert. Die Überführung der Reflektionsdatei *XDS_ASCII.HKL* in das MTZ-Format wurde mit *XDSCONV* durchgeführt und eine Teilmenge von zufällig ausgewählten 5% aller Reflexe zur R_{free} -Wert Berechnung verwendet. Der Datensatz wurde in der monoklinen Raumgruppe *C2* prozessiert mit einem TGT-Monomer pro asymmetrische Einheit und einem Matthews-Koeffizient von 2.4 Å³ Da⁻¹.

4.6.7 Strukturbestimmung, Verfeinerung und Analyse

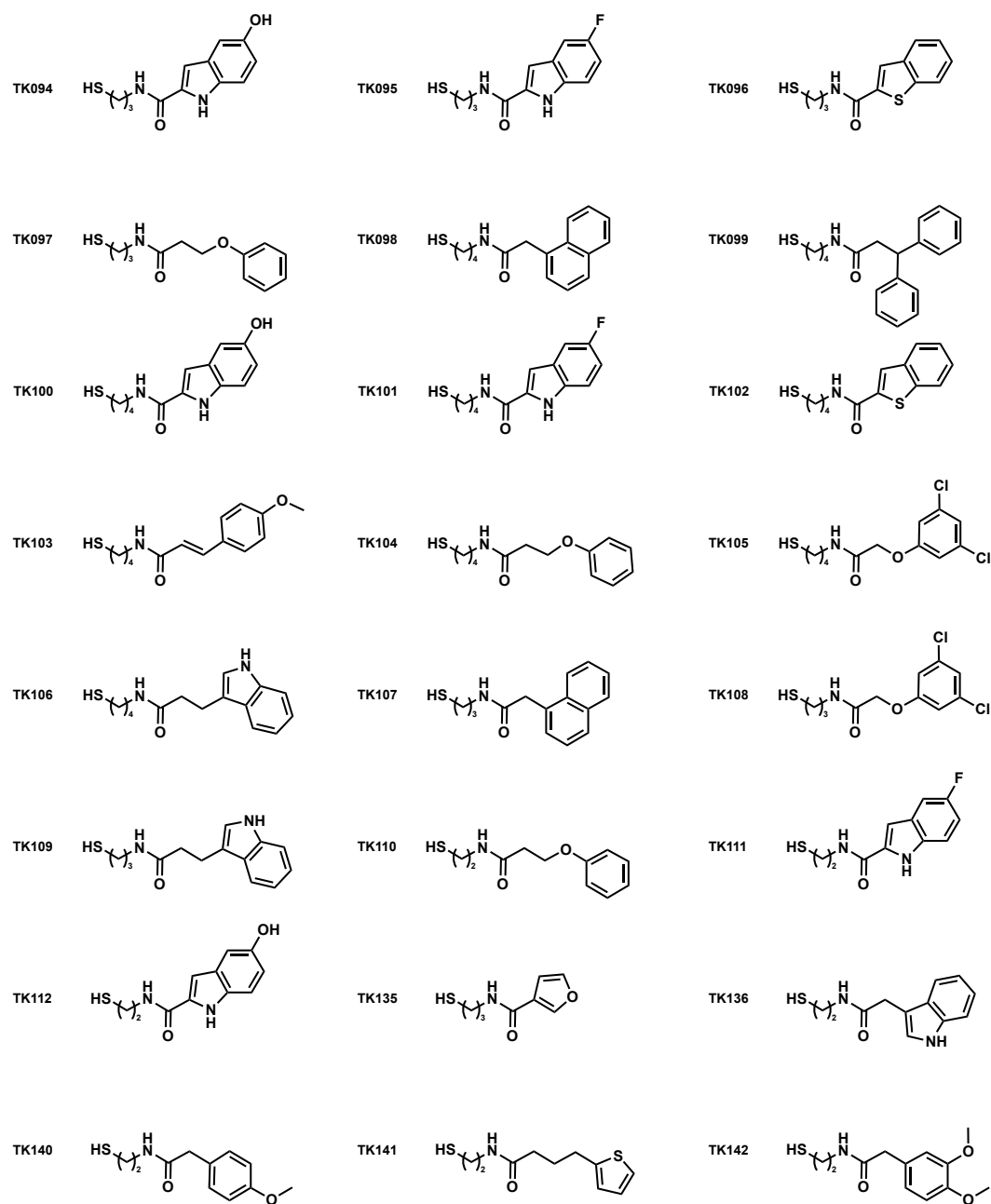
Die Phasen der Kristallstrukturen wurde durch die Anwendung des molekularen Ersatzes mit Hilfe des Moduls *Phaser*^[80] aus *CCP4*^[81] bestimmt. Als Suchmodell diente die in der PDB-Bank hinterlegte Kristallstruktur mit dem Code 1PUD^[32]. Zwischen den Verfeinerungszyklen mit *phenix-refine* (1.16_3549)^[82] wurde *Coot*^[83] zur Modellbuanpassung verwendet. *Simulated Annealing* mit Standard Einstellungen wurden zunächst durchgeführt, gefolgt von weiteren Zyklen mit *Coorindate xyz*, *Occupancy*. *B*-Werte wurden für alle Atome anisotrop verfeinert und anschließend wurden alle Atome mit Wasserstoffatomen als *riding hydrogens* versetzt, jedoch Wasserstoffe von auftretenden Lösungsmittelmolekülen und Ligand entfernt. Alternative Seitenkettenkonformationen, fehlende Aminosäuren, Wassermoleküle wurden in wohldefinierte mF_o-DF_c -Elektronendichte eingebaut und während der Verfeinerung beibehalten, wenn sie in einer $2F_o-F_c$ -Elektronendichte wiedergefunden wurden und die Besetzung größer als 20% war (alternative Seitenkettenkonformationen und Ligand). Nur Wassermoleküle, die nach der Verfeinerung durch eine $2F_o-F_c$ Elektronendichte von $\sigma < 1.0$ RMSD, einen *B*-Faktor nicht signifikant größer als 55 Å² und Abstände zwischen 2.3 Å und 3.5 Å zu umgebenden Atomen aufwiesen, wurden in der Struktur beibehalten. Die grafische Darstellung der Kristallstruktur-Koordinaten und Elektronendichte-Karten erfolgte mit *Chimera*^[84].

4.7 PDB Zugangscodes

Koordinaten, sowie Strukturfaktoren von TGT in Komplex mit Ligand **4.2** wurde in der *RCSB Protein Data Bank* (PDB) mit dem Zugangscode 6YGV (**TGT-4.2**) hinterlegt.

4.8 Generelle Informationen

4.8.1 Tethering-Bibliothek



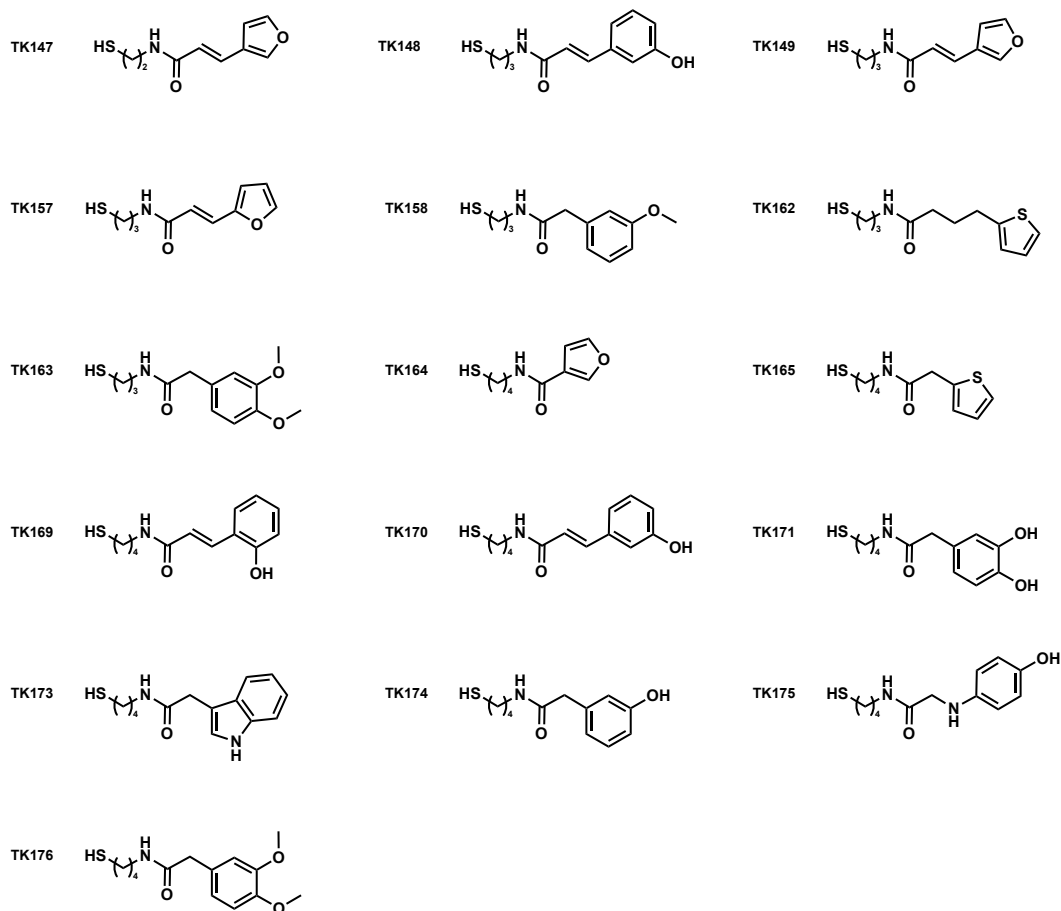


Abbildung S 4.1 Verwendete Disulfid-Verbindungen zum Disulfid-*Tethering*-Experiment an TGT-Variante C158S/C281S/Y330C/H333A. Die Verbindungen liegen als unsymmetrische Disulfide vor, verbunden mit einer Linkereinheit bestehend aus einem Aminothiols mit der gleichen Länge zwischen Amid und Thiolgruppe. Verbindungen wurden zur Untersuchung entsprechend der Konzentration in DMSO gelöst und bei -20°C gelagert.

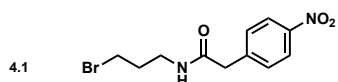


Abbildung S 4.2 Verwendeter Bromoalkylamid zur nukleophilen Reaktion mit TGT-Variante C158S/C281S/Y330C/H333A. Die Verbindung wurde zur Untersuchung entsprechend der Konzentration in DMSO gelöst und bei -20°C gelagert.

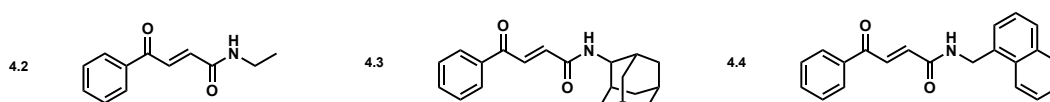


Abbildung S 4.3 Verwendete Acrylamide zur gezielten Proteinmodifikation mit TGT-Variante C158S/C281S/Y330C/H333A. Die Verbindungen wurde zur Untersuchung entsprechend der Konzentration in DMF gelöst und bei -20°C gelagert.

4.8.2 Kristallographische Tabelle

Tabelle S 4.1 Datensammlung und Verfeinerungsstatistik für die Kristallstruktur **TGT-4.2** in Komplex mit TGT C158S/C281S/Y330C/H333A.

TGT-Chapter.Ligand	TGT-4.2
PDB ID	6YGV
(A) Data collection and processing	
Collection site	BESSY 14.1
No. crystals used	1
Wavelength λ [Å]	0.91841
Space group	C2
Unit cell parameters	
a [Å]	90.8
b [Å]	64.9
c [Å]	71.1
β [°]	95.7
(B) Diffraction data	
Resolution range [Å]	45.19 – 1.63 (1.76 – 1.63)
Unique reflections	50766 8139
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	4.0 (49.5)
Completeness [%]	99.5 (99.5)
Redundancy	6.8 (6.8)
$I/\sigma(I)$	25.6 (3.4)
Wilson B-factor [Å ²]	23.0
Matthews Coefficient [Å ³ ·Da ⁻¹] ^[a]	2.4
Solvent content [%] ^[a]	49.5
Molecules in asymmetric unit	1
(C) Refinement with Phenix	
PHENIX version	1.16_3549
Resolution range [Å]	45.2 – 1.63
Reflections used for R_{free}	2539
Reflections used for R_{work}	48227
Final R values	
R_{free} [%]	16.4
R_{work} [%]	13.1
No. of atoms (non-hydrogen)	
Protein atoms	2878
Water molecules	297
Ligand atoms	15
RMSD from ideality	
Bond angles [°]	1.0
Bond length [Å]	0.008
Ramachandran plot^[b]	
Most favoured regions [%]	94.6
Additionally allowed regions [%]	5.1
Generously allowed regions [%]	0.3
Mean B-factors [Å²]^[c]	
Protein atoms	30.8
Water molecules	42.13
Ligand atoms	35.3

Die Schale mit der höchsten Auflösung wird durch Werte in Klammern beschrieben. ^[a] Matthews coefficient und solvent content wurden mit dem Programm *Matthews_coef* aus der CCP4-Reihe (8.4) berechnet. ^[81]

^[b] Ramachandran-Plots wurden mit *PROCHECK*^[85] und ^[c] mittlere B-Faktoren wurden mit *MOLEMAN*^[86] berechnet.

4.8.3 Massenspektren

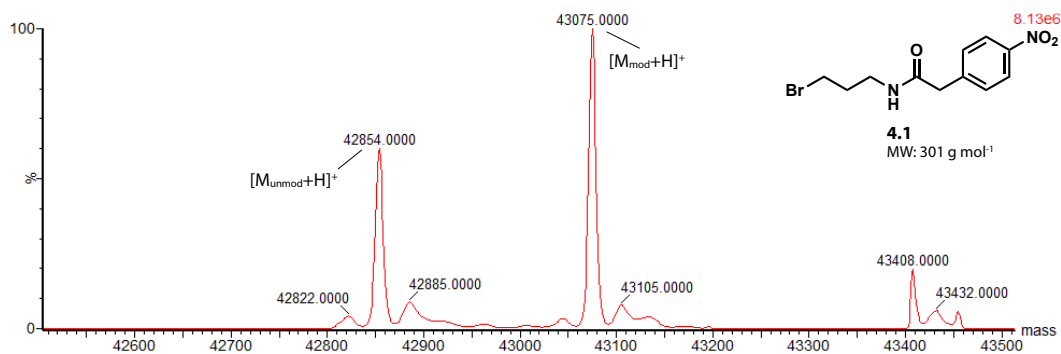


Abbildung S 4.4 ESI-Massenspektrum aus dem gereinigten Reaktionsgemisch aus TGT C158S/C281S/Y330C/H333A (20 μ M) mit 60 eq. **4.1** bei 37 °C und zwei Stunden Reaktionszeit.

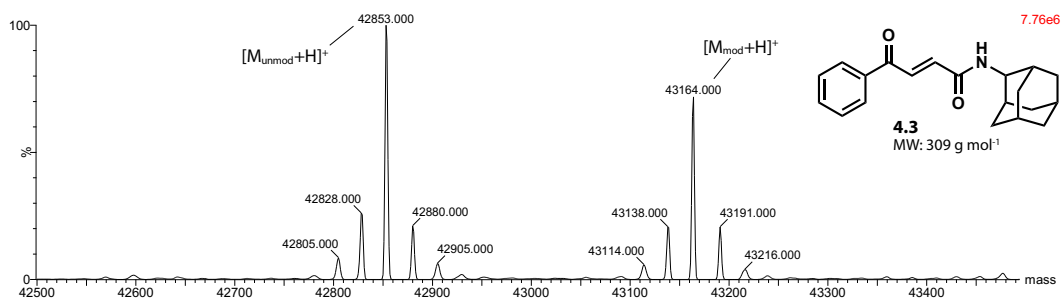


Abbildung S 4.5 ESI-Massenspektrum aus dem gereinigten Reaktionsgemisch aus TGT C158S/C281S/Y330C/H333A (20 μ M) mit 30 eq. **4.3**, 0.2 mM TCEP bei Raumtemperatur und zwei Stunden Reaktionszeit.

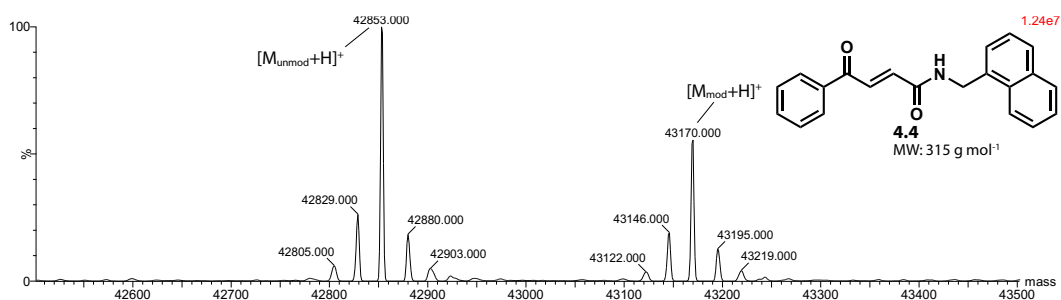


Abbildung S 4.6 ESI-Massenspektrum aus dem gereinigten Reaktionsgemisch aus TGT C158S/C281S/Y330C/H333A (20 μ M) mit 30 eq. **4.4**, 0.2 mM TCEP bei Raumtemperatur und zwei Stunden Reaktionszeit.

5

Kapitel 5

Die Ladungsbedeutung im aromatischen *Hot Spot* zur Stabilisierung der Protein-Protein-Grenzfläche in der homodimeren tRNA-Guanin-Transglycosylase

The importance of charge in perturbing the aromatic glue stabilising the protein-protein interface of homodimeric tRNA-guanine transglycosylase

A. NGUYEN^{1*}, D. NGUYEN^{1*}, T. X. P. NGUYEN¹, M. SEBASTIANI¹, S. DÖRR¹, O. HERNANDEZ-ALBA², F. DEBAENE², S. CIANFÉRANI², A. HEINE¹, G. KLEBE¹, K. REUTER¹

*Diese Autoren haben im gleichen Maße beigetragen

¹Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg,
Marbacher Weg 6–10, D-35037 Marburg, Deutschland

²Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg,
CNRS, IPHC UMR, 7178, 67000 Strasbourg, France

5.1 Vorwort

Das folgende Projekt basiert auf den Arbeiten von TRAN XUAN PHONG NGUYEN und wurde im Rahmen der Doktorarbeit des Autors experimentell übernommen. Die Proteinreinigung, kristallographische Analyse mit Ausnahme einer Struktur und die Bestimmung der Schmelzpunkte verschiedener Proteinvarianten wurden vom Verfasser durchgeführt. Die kinetischen Parameter diverser TGT-Proteine wurden im Zuge der Arbeit von DZUNG NGUYEN, STEFANIE DÖRR (Arbeitsgruppe PROF. DR. GERHARD KLEBE, Philipps-Universität Marburg, Deutschland) und MAURICE SEBASTIANI (Arbeitsgruppe PROF. DR. KLAUS REUTER, Philipps-Universität Marburg, Deutschland) bereitgestellt. Durch Kooperation mit der Arbeitsgruppe um DR. SARAH CIANFÉRANI (Université de Strasbourg, Frankreich) konnten native massenspektrometrische Ergebnisse mit Hilfe von DR. OSCAR HERNANDEZ-ALBA und DR. FRANÇOIS DEBAENE erhalten werden. Die initiale Version der Publikation wurde von PROF. DR. KLAUS REUTER verfasst.

5.2 Kurzfassung

Die Funktionalität der tRNA-Guanin-Transglycosylase ist durch die Beschaffenheit als Dimer gegeben. Somit scheint die Störung der Dimerbildung sowie die Regulation der Protein-Protein-Grenzfläche eine Möglichkeit für therapeutische Maßnahmen zu sein. Es wurde ein aus vier aromatischen Aminosäuren bestehender Cluster identifiziert, der essentiell für die Stabilität der Dimer-Kontakte ist. Gezielte Mutagenese wurde an diesem aromatischen *Hot Spot* sowie nahe der Dimer-Grenzfläche angewandt und ihre Auswirkungen auf die Dimerstabilität mittels Röntgenkristallstrukturanalyse, nativer Massenspektrometrie, Enzymkinetik und *Thermal-Shift*-Assay untersucht. Störungen des aromatischen Clusters wirken sich signifikant auf die Stabilität des Dimers aus, welches im Zusammenhang mit dem hochflexiblen Schleifen-Helix-Motiv steht. Es hat sich gezeigt, dass die Protonierung von Histidin innerhalb des aromatischen Clusters wesentlich für den Kollaps an der Dimer-Grenzfläche verantwortlich ist. Im geordneten Zustand des Proteins nimmt dieses Motiv eine definierte Struktur an, die das Eindringen von Wassermolekülen in die Dimer-Grenzfläche verhindert.

5.3 Einleitung

Im Verlauf des angewandten Wirkstoffdesigns an *Z. mobilis* TGT wurden Inhibitoren in der aktiven Tasche des Enzyms entwickelt, die destabilisierend auf die Grenzfläche zwischen den Untereinheiten des TGT-Homodimers wirken. Diese Liganden basieren auf einem *lin*-Benzoguanin-Grundgerüst mit Substituenten an der C(4')-Position, die in die nahegelegene Dimer-Grenzfläche hineinragen und so Einfluss auf deren umgebenen Geometrien nehmen.^[40,56] Bemerkenswert ist die Eigenschaft einiger dieser Liganden, die die Drehung einer Untereinheit des Homodimers um etwa 130° gegenüber der zweiten Untereinheit induzieren. Diese außergewöhnliche Umlagerung führt schließlich zu einer unproduktiven Quartärstruktur des homodimeren Enzyms, die als *Twisted Dimer* bezeichnet wird. Obwohl es noch keine Hinweise darauf gibt, ob diese unkonventionelle Dimer-Form physiologisch relevant ist, könnte ihre Stabilisierung eine vielversprechende Strategie für das Design von TGT-Inhibitoren darstellen, da sie aus sterischer Inkompatibilität nicht in der Lage ist, ein tRNA-Substrat zu binden (Abbildung 5.1, siehe auch **Kapitel 2**).^[41]

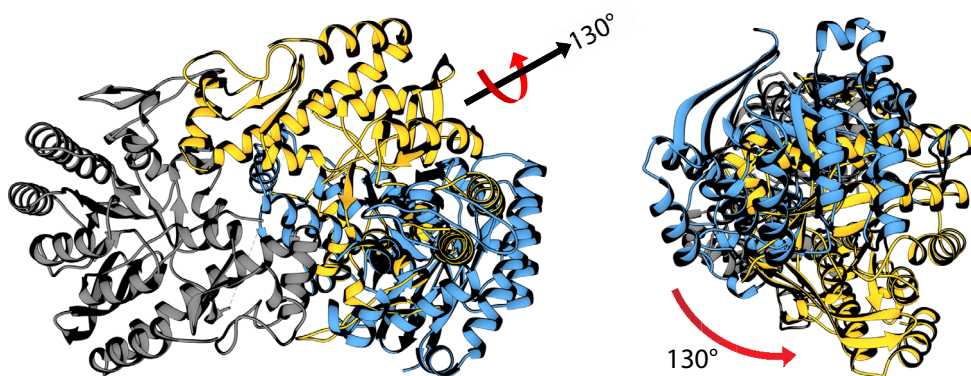


Abbildung 5.1 Überlagerung der Kristallstrukturen von *Z. mobilis*, ohne Ligand (C_{blau} , Raumgruppe: C_2 , PDB Code: 1PUD)^[32] und im Komplex mit einem *Twisted Dimer*-Ligand (C_{gelb} , Raumgruppe: P_2 , PDB Code: 5I07)^[41] aus zwei verschiedenen Blickwinkeln. Die graue Struktur zeigt die Übereinstimmung beider Untereinheiten.

Die Erkenntnis, dass kleine Liganden die Bildung des katalytisch aktiven TGT-Dimers stören können, führte zu einer detaillierten Untersuchung der Grenzflächenstruktur des Dimers. Basierend auf der Grundlage der *Z. mobilis* TGT-Apo-Struktur (PDB Code: 1P0D)^[34] ergab eine frühere Studie eine Dimer-Kontaktfläche von mehr als 1600 Å² mit je 43 Aminosäureresten pro Untereinheit im Kontakt. Zusätzlich zu den hydrophoben Wechselwirkungen, die mehr als 60% der Grenzflächenkontakte ausmachen, werden 14 Salzbrücken, sowie 10 Wasserstoffbrückenbindungen zu den Resten der zweiten Untereinheit beobachtet. Ein zusätzlicher Vergleich mit weiteren 43 *Z. mobilis* TGT Kristallstrukturen zeigt, dass die Grenzfläche flexibel formbar ist, obwohl die meisten Wechselwirkungen zwischen allen Strukturen analog vorhanden sind, einige einzelne Strukturen wiesen dennoch Unregelmäßigkeiten im Muster

auf. Bestätigt durch Molekuldynamik-Simulation (MD) und weitere *in silico*-Analysen wurde gezeigt, dass ein Cluster bestehend aus vier aromatischen Resten mit Abständen von 5 bis 6 Å eine besondere Rolle für die Stabilität des TGT-Dimers spielt.^[39] Drei dieser Aminosäuren, Trp326, Tyr330 und His333 befinden sich in bzw. in der Nähe der α -Helix E der einen Untereinheit, während die vierte Aminosäure Phe92' auf der gegenüberliegenden α -Helix 2c' der zweiten Untereinheit (Dimerpartner wird durch ein zusätzliches " ' " gekennzeichnet) liegt. Aufgrund der zweizähligen Symmetrie der Dimer-Paarung zueinander befindet sich dieser Cluster, wie praktisch alle bestehenden Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten, doppelt an der Grenzfläche.

Strukturell führen die Seitenketten von Trp326, Tyr330 und His333 mit ihren Wasserstoffdonor-Funktionen zu stabilen Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) an Carbonylgruppen der Hauptkette des Dimer-Partners und verankern dadurch ihre Position. So interagiert die NH-Gruppe des Indolrings von Trp326 mit der Carbonylgruppe von Met93' der α -Helix 2c'. Obwohl diese Wechselwirkung sehr persistent zu sein scheint, ist sie eine Besonderheit von *Z. mobilis* TGT, da in orthologen Proteinen der meisten anderen Bakterien Trp326 durch Phenylalanin oder Tyrosin ersetzt wird. Hingegen liegen Tyr330 und His333 in bakteriellen TGT-Enzymen invariant vor. Durch seine phenolische Hydroxygruppe bildet Tyr330 eine H-Brücke an den Carbonylsauerstoff von Ala49', während die N_H-Gruppe von His333 eine H-Brücke an den Carbonylsauerstoff von Ala48' bildet. Sowohl Ala48' als auch Ala49' sind Bestandteile der β 1 α 1-Schleife, die insgesamt die Reste Thr47 bis Lys55 umfassen. Zusammen mit der folgenden α -Helix 1 (Pro56 bis Thr62) bilden sie zusammen das sogenannte "Schleifen-Helix-Motiv" (Abbildung 5.2). In TGT-Kristallstrukturen, die einen intakten Dimer-Kontakt aufweisen, nimmt dieses Motiv eine wohldefinierte Konformation an, die die Grenzfläche vor Wassereintritt schützt. Die Bindung eines Dimer-destabilisierenden Liganden erzwingt jedoch meist einen deutlichen anderen Verlauf des Schleifen-Helix-Motivs, der bis zu seinem vollstän-

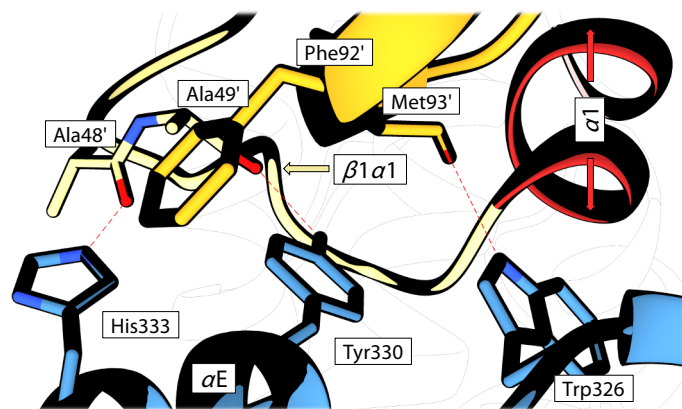


Abbildung 5.2 Darstellung des aromatischen Clusters innerhalb der Dimer-Grenzfläche in der *Z. mobilis* TGT (PDB Code: 1PUD)^[32]. Die Untereinheiten sind in gelb und blau abgebildet. Das Schleifen-Helix-Motiv (Thr47 – Thr62) ist in rot und hellgelb hervorgehoben. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau.

digen Kollaps seiner Struktur führen kann.^[40,41,57] Dieses Phänomen wird auch bei mehreren Kristallstrukturen von TGT-Varianten beobachtet, die gezielte Punktmutationen enthalten und dadurch die Architektur der Dimer-Grenzfläche beeinträchtigen.^[37–39]

Die vorliegende Studie konzentriert sich in erster Linie auf die Bedeutung der einzelnen H-Brücken, die von den vorherig erwähnten aromatischen Aminosäuren (Trp326, Tyr330 und His333) zum Dimerpartner ausgebildet werden. Durch die eingeführten Phenyl-Mutationen bleibt der aromatische Charakter erhalten, während die H-Brücke gezielt entfernt wird. Die Auswirkungen zum Verlust der H-Donor-Funktion wurde mittels Röntgenkristallstrukturanalyse, nativer Massenspektrometrie, *Thermal-Shift*-Assay und Enzymkinetik untersucht. Zusätzlich wurde eine TGT-Variante analysiert, in der Trp95 zu Phenylalanin mutiert wurde. Diese Variante stammte aus einer anderen Studie (**Kapitel 2**), lieferte jedoch kristallographische Beweise für die Destabilisierung des Schleifen-Helix-Motivs und ist daher ebenso an der Regulation der Dimer-Grenzfläche beteiligt.

5.4 Ergebnisse

5.4.1 Strukturelle und biochemische Charakterisierung

TGT Y330F

Tyr330 von *Z. mobilis* TGT trägt über die H-Brücke seiner phenolischen Hydroxylgruppe an Ala49' des Dimer-Partners, das in der bakteriellen TGT streng konserviert ist, zur Stabilisierung der Dimer-Grenzfläche bei. Um die Bedeutung dieser H-Brücke für die Stabilität des TGT-Homodimers auf struktureller Ebene zu untersuchen, wurde Tyr330 zu Phenylalanin mutiert. Aus früheren Arbeiten, die sich ebenfalls mit Austausch der *Hot Spot*-Aminosäuren beschäftigten, stachen zwei Kristallstrukturen einer K52M-Variante von TGT heraus, von denen eine bei pH 5.5 und die andere bei pH 8.5 gezüchtet wurde. Bemerkenswert ist, dass die Dimerdestabilisierende Wirkung der K52M-Mutation, insbesondere im Hinblick auf strukturelle Veränderungen innerhalb des Schleifen-Helix-Motivs (Thr47 bis Thr62), bei pH 5.5 viel ausgeprägter ausfallen als in der Kristallstruktur bei pH 8.5.^[37,39] Folglich wurden die TGT-Y330F-Variante und die nachfolgenden Strukturen sowohl bei pH 5.5 als auch bei 8.5 bestimmt.

Die Kristallstrukturanalyse der bei pH 8.5 gezüchteten TGT Y330F-Variante zeigte keine signifikanten Veränderungen an der Dimer-Grenzfläche, abgesehen von der fehlenden H-Brücke zwischen der Hydroxylgruppe von Tyr330 und Ala49'. Damit nimmt das Schleifen-Helix-Motiv eine mit dem Wildtypenzym vergleichbare Konformation in der Elektronendichtekarte ein. Im Gegensatz dazu beeinträchtigt die Y330F-Mutation das Schleifen-Helix-Motiv, wenn die Kristallstruktur bei einem pH-Wert von 5.5 bestimmt wird. Die ersten Reste Gly46, Thr47 sowie Ala48 nehmen einen Verlauf an, der von den üblicherweise beobachteten Strukturen

abweicht. Der verbleibende Teil des Schleifen-Helix-Motivs Ala49 bis Thr62 nimmt keine definierte Konformation ein, da er aufgrund der ungeordneten Anordnung im Kristall im Beugungsbild unsichtbar bleibt. Der Zusammenbruch des Schleifen-Helix-Motivs geht mit einer sichtbaren Verkipfung der α -Helices E und F einher, was zu einer Verschiebung der einen Untereinheit gegen die andere um etwa 3 Å führt (Abbildung 5.3). Diese Umorientierung ist deutlich messbar in den veränderten Einheitszellparametern im Vergleich zu den herkömmlichen *Z. mobilis* TGT-Kristallen. Während sich die a-Achse der Einheitszelle um 6 Å verkürzt, verringert sich im Zuge der β -Winkel ebenfalls um 2°. Dieses Muster ähnelt den Änderungen der Einheitszellparameter für die bereits erwähnte Kristallstruktur von TGT K52M, die ebenfalls bei pH 5.5 kristallisiert wurde^[37] sowie für mehrere Wildtyp-TGT-Kristalle bei pH 5.5, die aus der Kokristallisation des Enzyms mit Liganden, die die Ribose-34-Tasche adressieren, resultierten.^[40,41,57] In Abwesenheit solcher Liganden hat das Kristallwachstum generell bei pH 5.5 keinen Einfluss auf die Einheitszellparameter bzw. auf die Konformation des Schleifen-Helix-Motivs im Fall des Wildtyp-Proteins.

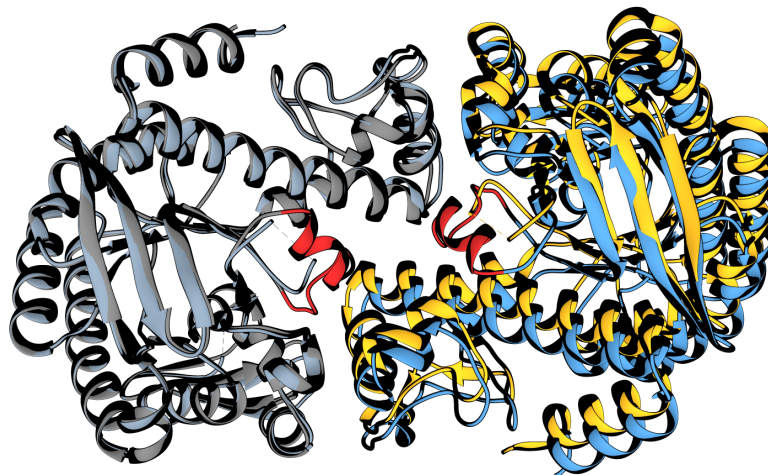


Abbildung 5.3 Darstellung der überlagerten *Z. mobilis* TGT-Y330F-Strukturen als Bändermodell, kristallisiert in pH 5.5 (Chellgrau+gelb, 1.38 Å Auflösung, PDB Code: 6YFX) und 8.5 (C dunkelgrau+blau, 1.40 Å Auflösung, PDB Code: 6Y GK). Das Schleifen-Helix-Motiv ($\beta 1 \alpha 1$ -Schleife und α -Helix 1) ist in rot dargestellt.

Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter von TGT-Y330F ergab, dass die eingeführte Mutation die Affinität des Enzyms zum tRNA-Substrat nicht beeinflusst. Sie bewirkt jedoch eine leicht verminderte katalytische Aktivität, da der k_{cat} -Wert von TGT-Y330F im Vergleich zur Wildtyp-TGT um den Faktor drei vermindert ist (Tabelle S 5.1). Um zu beurteilen, ob der Verlust der phenolischen Hydroxylgruppe in TGT-Y330F einen Einfluss auf die Gesamtstabilität des Enzyms ausübt, wurde die "Schmelztemperatur" (T_m) dieser Variante mittels *Thermal-Shift*-Assay gemessen.^[146] Unter den angepassten Bedingungen beträgt der Schmelzpunkt dieser Proteinvariante 66.0 ± 1.5 °C und ist damit etwas niedriger als die der Wildtyp-TGT ($T_m = 69.2 \pm 0.3$ °C).

Tabelle 5.1 "Schmelztemperaturen" (T_m) der in dieser Studie untersuchten TGT-Varianten

Proteinvariante	T_m [°C]
Wildtyp-TGT	69.2 ± 0.3
TGT-W95F	53.7 ± 0.5
TGT-Y330F	66.0 ± 1.5
TGT-W326F*	67.8 ± 0.4
TGT-H333F	71.7 ± 0.3
TGT-H333A	63.7 ± 0.0

Die Schmelzkurven und deren erste Ableitungen sind in Abschnitt 5.8 einsehbar. *Die Schmelzkurve von TGT-W326F enthält zwei Wendepunkte, die anzeigen, dass die Entfaltung bei dieser Variante möglicherweise in zwei Schritten erfolgt. Hier ist die T_m als die Durchschnittstemperatur des Übergangs der Proteinentfaltung definiert. Die zwei Schmelztemperaturen von TGT-W326F belaufen sich auf 63.4 ± 0.0 °C bzw. 73.7 ± 0.1 °C.

TGT_{5FW} W95F

Auch in Kristallstrukturen mit 5-Fluor-L-tryptophan-markiertem (5F-Trp) TGT-W95F wurden in Abhängigkeit vom angewandten pH-Wert, Auswirkungen der eingeführten Mutation auf die Dimer-Grenzfläche gefunden. Die Proteinvariante wurde im Rahmen eines weiteren Projekts hergestellt, das den Einfluss bestimmter TGT-Liganden auf die Bildung des unproduktiven *Twisted Dimer* biophysikalisch untersucht (**Kapitel 2**, Manuskript in Vorbereitung). Hierzu wurde die *Z. mobilis* TGT mit 5-Fluor-L-tryptophan für ¹⁹F-NMR-Analysen markiert ("TGT_{5FW}"). Um individuelle Signale zuordnen zu können, wurden drei der vier vorhandenen Tryptophanreste zu Phenylalanin mutiert und anschließend 5-Fluor-L-tryptophan-markiert exprimiert und gereinigt. Mit der Absicht, größere strukturelle Veränderungen innerhalb dieser Varianten auszuschließen, wurden die 5F-Trp-markierte Varianten sowie die 5F-Trp-markierte Wildtyp-TGT bei pH 5.5 kristallisiert und ihre Strukturen untersucht. Die Kristallstruktur des mit 5F-Trp-markierten Wildtyp-Proteins zeigte erwartungsgemäß keine signifikanten strukturellen Veränderungen im Vergleich zu der des nichtmarkierten Enzyms.

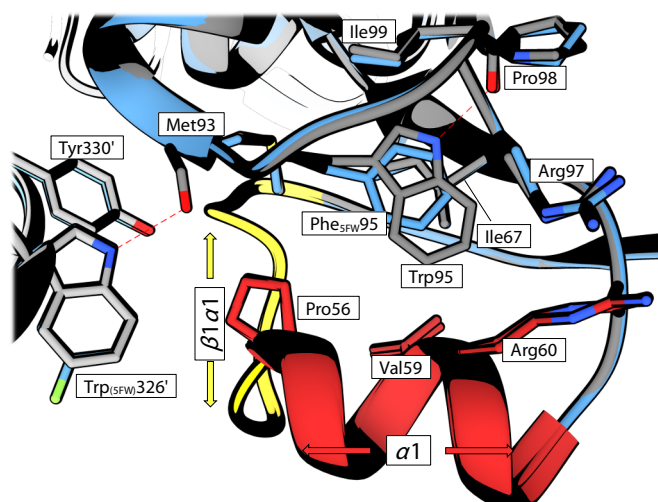


Abbildung 5.4 Darstellung der überlagerten *Z. mobilis* TGT-Strukturen Wildtyp-Protein (C_{grau}, pH 8.5, PDB Code: 1PUD)^[32] und TGT_{5FW}-W95F (C_{blau}, pH 8.5, PDB Code: 6YGO) als Bändermodell. Das Schleifen-Helix-Motiv bestehend aus α -Helix 1 und $\beta 1 \alpha 1$ -Schleife sind in rot und gelb abgebildet. Die Dimer-Partner sind in helleren Farbtönen sowie zusätzlich mit "''" markiert. Atom-Farbcode: O = rot, N = blau, F = grün.

Unerwartet zeigte der Kristall von TGT_{5FW}-W95F eine ähnliche Verkürzung der α -Achse um 6 Å und auch eine Verringerung des β -Winkels um etwa 2°, wie zuvor für TGT-Y330F beschrieben, wenn der Kristall bei pH 5.5 gezüchtet wurde. Obwohl sich Trp95 in unmittelbarer Nähe zur Dimer-Grenzfläche befindet, ist es nicht direkt an ihrer Bildung beteiligt. Vielmehr weist dessen Seitenkette in das Innere des Proteins, wo es Van-der-Waals-Interaktionen mit den Seitenketten Val59, Arg60 und Ile67 ausbildet, die alle Teil der α -Helix 1 des Schleifen-Helix-Motivs sind. Darüber hinaus werden außerhalb des Motivs weitere hydrophobe Kontakte zu Met93, Arg97 und Ile99 sowie eine H-Brücke zum Carbonylsauerstoff von Pro98 gebildet (Abbildung 5.4). Offenbar tragen die beschriebenen Wechselwirkungen zur stabilen Geometrie des Schleifen-Helix-Motivs bei, da die bei pH 5.5 wachsenden Kristalle ähnliche Konformationsänderungen am Motiv zeigen wie die pH 5.5-Struktur von TGT Y330F. Ähnlich zu TGT Y330F sind Gly46 – Ala48 umorientiert, während der restliche Teil des Schleifen-Helix-Motivs (Ala49 bis Thr62) kollabiert und in der Elektronendichtekarte nicht sichtbar ist.

Die reduzierte Stabilisierung des TGT-W95F-Dimers ist in den entsprechenden nativen Massenspektren deutlich zu erkennen. Die Menge des Enzym-Monomers steigt signifikant an, wenn Tryptophan an Position 95 durch Phenylalanin ersetzt wird ($36 \pm 3\%$). Dieser Effekt ist bei niedrigeren Konzentrationen (1 μ M) noch ausgeprägter, wo die Bildung des Monomers im Gleichgewicht stärker begünstigt wird ($51 \pm 3\%$). Der gleiche Effekt wird auch in beiden Massenspektren von TGT-W330F bei 10 und 1 μ M beobachtet, was ebenfalls zur verstärkten Bildung des Monomers führt ($45 \pm 2\%$ bzw. $65 \pm 5\%$). Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen von Kristallstrukturen überein, die darauf hindeuten, dass nichtkovalente Wechselwirkungen von Trp95 entscheidend für die Aufrechterhaltung der Protein-Protein-Grenzfläche sind. Im Gegensatz dazu hat die eingeführte Mutation dieser Variante keinen Einfluss auf die Dimer-Grenzfläche, sobald die Kristalle bei pH 8.5 gezüchtet werden. Strukturell zeigt Phe95 reduzierte hydrophobe Kontakte zur Umgebung und ist nicht in der Lage, eine H-Brücke zu dem Carbonylsauerstoff von Pro98 zu bilden. Dennoch stimmen das Schleifen-Helix-Motiv und die umgebenden Strukturelemente, einschließlich der Wassermoleküle, perfekt mit der Kristallstruktur des Wildtyp-TGT überein.

Um herauszufinden, ob die durch die W95F-Mutation verursachte reduzierte Dimer-Stabilität mit einer Abnahme der katalytischen Effizienz einhergeht, wurde k_{cat} und $K_{\text{m}}(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$ dieser Variante bestimmt. Um sicherzustellen, dass alle beobachteten potentiellen Unterschiede zwischen den katalytischen Eigenschaften von TGT_{5FW}-W95F und Wildtyp-TGT auf die eingeführte Mutation und nicht auf die 5F-Trp-Markierung von den Tryptophanresten zurückzuführen sind, wurden auch k_{cat} und $K_{\text{m}}(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$ von 5F-Trp-markiertem Wildtyp-Protein bestimmt. Innerhalb des Fehlerbereichs des verwendeten Assays wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen dem markierten und dem nichtmarkierten Enzym gemessen. Die katalytische Effizienz von TGT_{5FW}-W95F erwies sich im Vergleich zur Wildtyp-TGT als

leicht vermindert, wobei beide Veränderungen an der Grenze der Signifikanz liegen (Tabelle S 5.1). Wie mittels *Thermal-Shift*-Assay gezeigt wurde, führt die Substitution von Trp95 durch Pheylalanin zu einer stark verminderten thermischen Stabilität des Enzyms, da die T_m -Werte im Vergleich zu dem des Wildtyp-Proteins um 15.5 °C abnimmt (Tabelle 5.1).

TGT_{5FW} W326F

Im Verlauf des ¹⁹F-NMR-basierten Projekts (**Kapitel 2**) wurde zur Signalzuordnung die TGT_{5FW}-W326F-Variante hergestellt und unter anderen kristallisiert. Gewöhnlich bildet der Indolring von Trp326 eine stabile H-Brücke an den Carbonylsauerstoff von Met93' (siehe Abbildung 5.2). Dennoch treten in den meisten bakteriellen TGT-Enzymen anstatt des Trp326 ein Phenylalanin bzw. Tyrosin auf. Dementsprechend scheint die Mutation von Trp326 zu Phenylalanin in *Z. mobilis* TGT keine Konsequenzen auf die Stabilität des Homodimers zu haben. Weniger überraschend war daher, dass keine Veränderungen in der pH 5.5 Kristallstruktur von TGT_{5FW} W326F an der Dimer-Grenzfläche und dem Schleifen-Helix-Motiv festgestellt werden konnten. Folglich nimmt die Mutation keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität k_{cat} bzw. $K_m(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$ von TGT_{5FW}-W326F, die sich nicht signifikant von der des Wildtyps unterscheidet. Die Ergebnisse der nativen Massenspektrometrie zeigen, dass bei einer Konzentration von 1 und 10 µM der TGT-W326F-Variante die Stabilität des Homodimers durch die eingeführte Mutation nicht beeinflusst wird. Selbst bei niedrigen Konzentrationen entspricht die vorherrschende Monomerkonzentration der Proteinvariante einem ähnlichen Verhalten wie des Wildtyp-Proteins (<10%).

Folglich beeinträchtigt die Mutation nicht die katalytische Aktivität, wie sie sich in der k_{cat} und der $K_m(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$ der TGT-W326F-Variante widerspiegelt, die sich nicht signifikant von der des Wildtyp-Proteins unterscheidet (Tabelle 5.1). Darüber hinaus scheint die eingeführte Mutation die thermische Stabilität des Enzyms nicht zu beeinträchtigen. Die aus TGT-W326F gewonnene Schmelzkurve unterscheidet sich jedoch in ihrer Form von den übrigen Proteinvarianten, da sie zwei Wendepunkte enthält, die anzeigen, dass die Entfaltung in zwei Schritten erfolgt (Abbildung S 5.1). Definiert man die Schmelztemperatur als die mittlere Temperatur des Entfaltungsübergangs des Proteins, beträgt T_m 67.8 ± 0.4 °C.

TGT H333A und TGT H333F

Über die N_εH-Gruppe bildet das nahezu über alle bakteriellen Enzyme konservierte His333 eine H-Brücke an Ala48' des Dimerpartners. Hierzu wurde die Bedeutung der Imidazol-Gruppe auf zwei Wegen für die Stabilität der Dimer-Grenzfläche untersucht. Eine Mutation des Histidins zu einem Phenylalanin behält den aromatischen Charakter bei, dessen Seitenkette nicht die H-Donor-Eigenschaft besitzt, während bei einer Mutation zu Alanin beide Eigenschaften vollständig fehlen.

Der Ersatz von His333 durch Phenylalanin wirkt sich nur mäßig auf die Dimer-Stabilität aus. Lediglich bei einer Untereinheitenkonzentration von 1 μM ist bei dieser Variante ein geringer Monomeranteil (etwa 4%) erkennbar, während bei einer Proteinkonzentration von 10 μM keine signifikante Menge an Monomer vorhanden ist. Darüber hinaus hat die Mutation keine negativen Auswirkungen auf die thermische Stabilität des Enzyms, da der T_m -Wert von TGT-H333F im Vergleich zu dem des Wildtyp-Enzyms sogar leicht erhöht ist (Tabelle 5.1). Dennoch zeigt diese Variante eine deutlich reduzierte Umsatzzahl, die fünfmal niedriger ist als die des Wildtyp-Proteins (Tabelle S 5.1).

In Übereinstimmung mit dem geringen Einfluss der H333F-Mutation auf die Dimer-Stabilität zeigt dessen pH 8.5-Kristallstruktur keinen Einfluss der eingeführten Mutation auf die Architektur der Dimer-Grenzfläche. Somit ist das Schleifen-Helix-Motiv in der Elektronendichtekarte hervorragend definiert und liegt in der gleichen Konformation wie in der Kristallstruktur der ligandenfreien Wildtyp-TGT vor. Unerwartet ist auch in der pH 5.5-Kristallstruktur von TGT-H333F, dass keine Störung der Homodimer-Grenzfläche sichtbar ist. Hier, wie auch in der pH 8.5-Kristallstruktur dieser Variante, ist das Schleifen-Helix-Motiv in der Elektronendichtekarte perfekt definiert und seine Konformation unterscheidet sich nicht von der des Wildtyp-Proteins. Folglich gibt es keine Veränderungen der Einheitszellparameter wie der Verkürzung der a -Achse und Verkleinerung des β -Winkels, die in den pH 5.5-Kristallstrukturen weiterer TGT-Varianten beobachtet werden, die Mutationen beherbergen, die die Dimer-Grenzfläche destabilisieren. Obwohl die H333F-Mutation nur einen mäßigen Einfluss auf die Dimer-Stabilität hat, erscheint dieser Befund überraschend, da, wie bereits beschrieben, die Imidazolgruppe von His333 eine H-Brücke zu Ala48' innerhalb der $\beta 1' \alpha 1'$ -Schleife ausbildet. Da diese H-Brücke eindeutig an der Stabilisierung der Konformation der $\beta 1' \alpha 1'$ -Schleife beteiligt ist, wurde erwartet, dass ihr Verlust zumindest einige strukturelle Veränderungen in dieser Region verursacht. Dies begründet sich aus der Beobachtung, dass die Kristallisation bei pH 5.5 bei einigen TGT-Varianten mit einer destabilisierten Dimer-Grenzfläche zum vollständigen Zusammenbruch des Schleifen-Helix-Motivs geführt hat. Dieser Befund warf die Frage auf, ob es vielleicht die Protonierung von His333 bei pH 5.5 ist, die eine elektrostatische Umgebung erzeugt, die die Stabilität und Konformation des Schleifen-Helix-Motivs stark beeinträchtigt.

Um diese Annahme zu untermauern, wurde His333 zu Alanin mutiert. Der Verlust der aromatischen Seitenkette führt nicht nur zum Verlust günstiger Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit nahegelegenen hydrophoben Resten, sondern soll auch den Zugang von Wasser in die Dimer-Grenzfläche erleichtern. Dementsprechend erwarteten wir, dass diese Mutation die Stabilität des Homodimers stark beeinträchtigen würde. Doch genau wie die Seitenkette des Phenylalanins ist die Methylgruppe der Seitenkette des eingeführten Alanins nicht in der Lage, ein Proton aufzunehmen.

Die native Massenspektrometrie zeigt, dass die Abwesenheit des aromatischen Rückstands in TGT-H333A tatsächlich eine ausgeprägte Destabilisierung des Homodimers nach sich zieht. Bei einer Untereinheitenkonzentration von 10 μM beträgt der Monomeranteil dieser Variante 45%, während er bei einer Untereinheitenkonzentration von 1 μM auf 80 % ansteigt. Trotz der stark verminderten Stabilität des TGT-Homodimers werden in der pH 8.5-Kristallstruktur dieser Variante nur mäßige strukturelle Auswirkungen der eingeführten Mutation beobachtet. Das Fehlen des Imidazols verursacht keine Veränderung in der Konformation der verbleibenden Reste des aromatischen Clusters. Darüber hinaus ist der Verlauf des Schleifen-Helix-Motivs nahezu identisch mit denen in Kristallstrukturen des Wildtyps zu beobachteten. Lediglich Thr47 bis Ala49 nehmen offensichtlich keine eindeutige Konformation an, da sie in der Elektronendichtekarte schlecht definiert sind. Dasselbe gilt insbesondere für die Struktur von TGT-H333A, die aus einem Kristall bestimmt wurde, der bei pH 5.5 gezüchtet wurde. Auch hier findet sich das Schleifen-Helix-Motiv in seiner üblichen Konformation wieder, abgesehen von den Resten Thr47 bis Ala49, die ebenfalls in der Elektronendichtekarte schlecht definiert sind. Offensichtlich spielt das Histidin an Position 333 eine ganz besondere Rolle hinsichtlich der Integrität der Dimer-Grenzfläche. Entsprechend seinem pK_a in wässriger Lösung fängt His333 vermutlich ein Proton bei pH 5.5 ein. Wie verschiedene Kristallstrukturen zeigen, löst der positiv geladene Histidinrest den Kollaps des Schleifen-Helix-Motivs in TGT-Varianten aus, deren Dimer-Stabilität aufgrund der eingeführten Mutation reduziert ist.

Die Mutation von His333 zu Alanin führt zu einer deutlich reduzierten thermischen Stabilität des Enzyms, da die T_m von TGT-H333A im Vergleich zu der des Wildtyp-Enzyms um 5.5 °C verringert ist. Damit ist jedoch keine signifikante Reduktion der katalytischen Aktivität verbunden, da die Umsatzzahl dieser Variante kaum niedriger ist als die des Wildtyp-Proteins (Tabelle S 5.1). Wichtig ist, dass die unerwartet hohe k_{cat} von TGT(His333Ala) mit einer weiteren Präparation dieser mutierten Variante reproduzieren konnten, ohne jedoch die aufwändige vollständige Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter zu wiederholen (Daten nicht gezeigt).

5.4.2 Einfluss der tRNA auf die Dimer-Stabilität

Insbesondere in frühen Studien aus den Jahren 1995 und 1996 mutierten CHONG *ET AL.* und GARCIA *ET AL.* His317 in *Escherichia coli* TGT, das His333 in *Z. mobilis* TGT entspricht, zu Alanin bzw. Cystein.^[147,148] Mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) hatte diese Gruppe in einer früheren Arbeit gezeigt, dass das Enzym ein Homo-Oligomer bildet.^[149] Seine Stöchiometrie war jedoch noch unbekannt, da zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Studien noch keine Kristallstruktur eines TGT-Enzyms verfügbar war. Nach visueller Inspektion der Primärstruktur von *E. coli* TGT nahmen CHONG *ET AL.* zu Recht an, dass das Enzym ein Zn^{2+} -Ion enthält, das durch die Thiolgruppen von drei Cysteinen und einer

Imidazolgruppe eines Histidins koordiniert wird.^[147] Während sie Cys302, Cys304 und Cys307 (entsprechend Cys318, Cys320 und Cys323 in *Z. mobilis* TGT) korrekt als die Zn^{2+} -koordinierenden Cysteine identifizierten, nahmen sie fälschlicherweise an, His317 sei das Zn^{2+} -koordinierende Histidin. Um die mutmaßliche Rolle von His317 bei der Zn^{2+} -Bindung zu untersuchen, mutierten sie diesen Rest zu Alanin. Während *E. coli* TGT-H317A immer noch Zn^{2+} enthält, zeigten die Autoren mittels nativer PAGE, dass seine Fähigkeit, ein Homo-Oligomer zu bilden und seine Fähigkeit, die Substrat-tRNA zu binden, signifikant beeinträchtigt sind. Folglich (und im Widerspruch zu den Ergebnissen dieses Kapitels) beobachteten sie eine reduzierte katalytische Aktivität für *E. coli* TGT-H317A, ohne jedoch Michaelis-Menten-Parameter für diese mutierte Variante zu bestimmen. In einer nachfolgenden Studie mutierten GARCIA ET AL. His317 von *E. coli* TGT zu Cystein.^[148] Mittels nativer PAGE zeigten sie, dass unter den getesteten Bedingungen TGT-H317C in Abwesenheit der Substrat-tRNA kein Homo-Oligomer bildet. In Gegenwart von Substrat-tRNA bildet es jedoch eindeutig den intakten aktiven Komplex, von dem inzwischen bekannt ist, dass er aus dem TGT-Homodimer und einem tRNA-Molekül besteht. Ähnlich wie bei *Z. mobilis* TGT-H333A sind k_{cat} und $K_{\text{m}}(\text{tRNA})$ von *E. coli* Tgt-H317C im Vergleich zum Wildtyp-Enzym kaum beeinträchtigt. Insgesamt scheint es überraschend, dass TGT-Varianten mit Mutationen, die die Stabilität des Homodimers stark beeinflussen, nur eine geringe oder fast keine Verringerung der katalytischen Aktivität zeigen. Wir haben dieses Phänomen auch in vergangenen Studien beobachtet.^[38,39] Wahrscheinlich kann die Anwesenheit eines tRNA-Substrats die Bildung und den Erhalt des Homodimers stark fördern.

5.4.3 Die Beständigkeit des dimeren Zustandes der TGT

Für die Reinigung des rekombinant-exprimierten TGT-Proteins aus *Z. mobilis* wurde ein Plasmid verwendet, das für das TGT-Enzym kodiert, das am *N*-terminalen Ende mit einem *Strep-Tag II*[®] fusioniert ist und das über eine Thrombin-Schnittstelle proteolytisch entfernt werden kann.^[38] Um die Kinetik des Wechsels zwischen den Untereinheiten zu untersuchen, wurde dieses Konstrukt zur Bestimmung der TGT-Homodimerkonstante verwendet. Zu diesem Zweck wurde TGT, das den *N*-terminalen *Strep-Tag II*[®] enthielt, mit der gleichen äquimolaren Menge TGT ohne diesen *Tag* gemischt. Der Austausch der Untereinheiten wurde zeitlich mit Hilfe der nativen Massenspektrometrie verfolgt, indem das Auftreten des "Heterodimers", bestehend aus markierter und unmarkierter Untereinheit beobachtet wurde (Abbildung 5.5a). Während unmittelbar (ca. 2 min) nach dem Mischen der beiden TGT-Präparate im Fall des Wildtyp-Proteins praktisch keine "heterodimere" TGT in den Massenspektren identifiziert werden konnte, war das Gleichgewicht der 50% heterodimeren TGT nach ca. 10 h erreicht (Abbildung 5.5b). Im Gegensatz dazu wurde im Fall der TGT-

Mutante H333A das Gleichgewicht in weniger als 10 Minuten erreicht, was die These einer stärker beeinträchtigten Dimer-Stabilität durch die eingeführte Mutation stützt (Abbildung

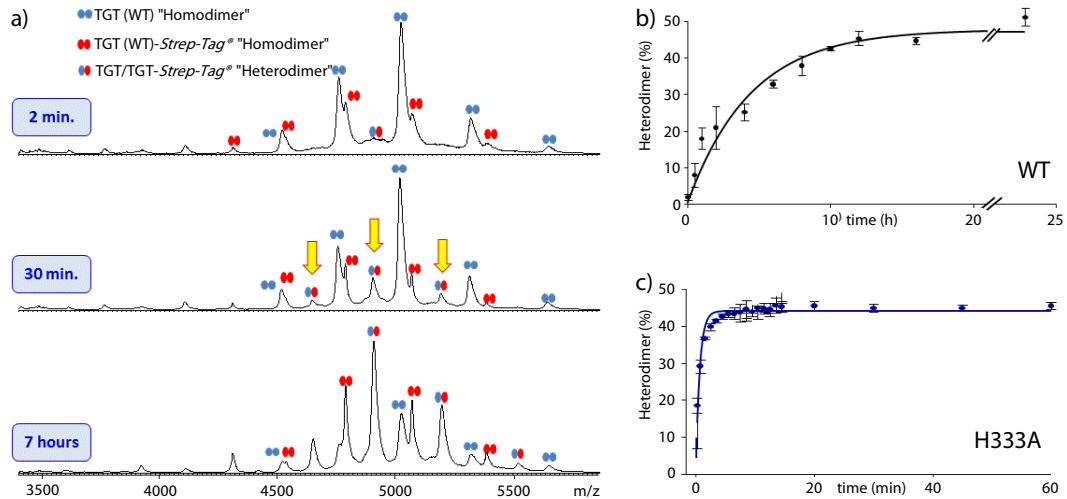


Abbildung 5.5 a) Spektren der zeitaufgelösten nativen Massenspektrometrie während des Austauschprozesses der Untereinheiten zwischen markierter TGT mit *Strep-Tag*®// und TGT ohne *Tag*. **b)** Kinetik des Austauschs von Untereinheiten beim Wildtyp-TGT und **c)** bei TGT-Variante H333A.

5.5c).

5.5 Diskussion und Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der sukzessive Ersatz von aromatischen Aminosäuren an und nahe der Dimer-Grenzfläche durch Aminosäuren mit reduzierter Funktionalität durchgeführt. Die Bedeutung der einzeln untersuchten Aminosäuren wurde in Bezug auf die Dimerstabilität mittels kristallographischer Analyse, nativer Massenspektrometrie, Enzymkinetik und deren Schmelztemperaturen untersucht. Generell ergaben statistische Auswertungen eine hohe Auftretswahrscheinlichkeit von aromatischen Resten, insbesondere Tyrosin und Tryptophan, als wichtige Beiträge innerhalb Protein-Grenzflächen.^[150–153] Durch ihre aromatische Natur können sie leicht polarisiert werden, was es ihnen ermöglicht, entweder mit ionischen, polaren oder hydrophoben Gruppen zu interagieren, die von den interagierenden Spezies bereitgestellt werden.^[154] Darüber hinaus sind Histidin, Tyrosin und Tryptophan in der Lage, ihre räumliche Orientierung durch zusätzliche H-Brücken zu stabilisieren.

Die aromatischen Aminosäuren Trp326, Tyr330 und His333 bilden mit ihrer Donor-Funktion H-Brücke jenseits der Dimer-Grenzfläche mit den Rückgrat-Carbonylgruppen des komplementären Dimer-Partners. Einerseits liegt in der Regel das Rückgratsegment mit einer eingeschränkten räumlichen Geometrie vor und erfordert daher einem gut organisierten Interaktionsmuster zwischen beiden Monomeren. Auf der anderen Seite befinden sich zwei der drei

miteinander wechselwirkenden Rückgrat-Carbonylgruppen auf dem hochflexiblen Schleifen-Helix-Motiv, das in den vielen Kristallstrukturen häufig mit unterschiedlichen Konformationen beobachtet werden kann. Es wird daher angenommen, dass dieses Motiv in der monomeren Form des Proteins über mehrere Konformationen verstreut vorliegt und sich der umgebenden Struktur anpasst. Insbesondere ist es möglich, das Motiv zu beeinflussen, indem geeignete Liganden verwendet werden, die Substituenten tragen, die aus Richtung der aktiven Tasche in die Nähe des kritischen Motivs platziert werden können.^[57]

Die untersuchten Mutationen der einzelnen Reste innerhalb des aromatischen Clusters modifizieren die Dimer-Grenzfläche in deutlich unterschiedlichem Ausmaß. Ein Austausch der streng konservierten Aminosäure Tyr330 gegen Phenylalanin führt zunächst nicht zu einer Positionsänderung der übrigen aromatischen Aminosäuren. Dennoch ist zu erkennen, dass das Fehlen der H-Brücke der Hydroxylgruppe von Tyr330 an Ala49', zu einen Teil des Schleifen-Helix-Motivs, eine starke Destabilisierung dieses Motivs bei pH 5.5 bewirkt. Obwohl bei diesem Austausch nur eine Wechselwirkung entfernt wird, führt dies nicht zu massiven Änderungen in der umgebenden Wasserstruktur.

Überraschend ist auch, dass eine Mutation an Position 95, die normalerweise durch ein Tryptophan besetzt wird und zum Inneren des Proteins hin orientiert ist, ebenfalls eine destabilisierende Wirkung auf das Schleifen-Helix-Motiv hat. Fixiert wird Trp95 üblicherweise durch eine H-Brücke an den nahegelegenen Pro98 Carbonylgruppe. Eine Reduzierung des aromatischen Systems zu einem Phenylring, entfernt zunächst die bereits erwähnte Fixierung und zudem nimmt der sterische Volumenanspruch des aromatischen Rings inmitten des unveränderten Schleifen-Helix-Motivs ab. Der eingeführte Phe95-Ring liegt bezogen auf den ehemaligen Indolring zentriert vor. Dadurch vergrößern sich die Abstände zu den vorherig genannten hydrophoben Resten, wodurch eine höhere Beweglichkeit des Schleifen-Helix-Motivs ermöglicht wird. Sehr beeindruckend ist die Bestimmung der Schmelztemperatur dieser Variante, der 15.5 °C unter dem der Wildtyp-Variante liegt. Sie spiegelt die Bedeutung der Aminosäure in dieser Position für die Proteinstabilität wider, obwohl dies nicht in gleichem Maße durch die kinetischen Daten wiedergegeben wird. Eine nähere Untersuchung dieser Position im Zuge einer weiteren Reduzierung auf ein Alanin wäre in dieser Hinsicht interessant und lässt Raum für mögliche Folgeuntersuchungen zu. Insbesondere zeigten Untersuchungen in **Kapitel 2**, dass Trp95 entscheidend für regulative Mechanismen zur Dimer-Anordnung verantwortlich sein könnte.

Der Tausch von Trp326 zu Phenylalanin bedingt keine strukturellen Konsequenzen im Vergleich zum Wildtyp. Ebenfalls bestätigt eine Schmelzpunktbestimmung ($\Delta T_m [\text{WT} \rightarrow \text{W95F}] = -1.5 \text{ °C}$) diese Beobachtung. Im Wildtyp interagiert der Indolstickstoff mit dem Carbonylsauerstoff von Met93'. Durch das Fehlen dieser Interaktion in der Mutante wird dennoch keine

signifikante Änderung des Clusters oder Met93' Rückgrats wahrgenommen. Basierend auf den biophysikalischen Studien an der Mutante W326F ist die 180°-Drehung von Trp326 in einigen Kristallstrukturen der TGT nicht auf eine Destabilisierung zurückzuführen, sondern resultiert aus einer erhöhten Rest-Flexibilität bei Schwächung der Dimer-Grenzfläche.^[41]

Die Mutation His333 zu Phenylalanin führt zum Verlust der Wechselwirkung von der N_εH-Gruppe des Histidins zum Carbonylsauerstoff von Ala48' des Schleifen-Helix-Motivs. Insgesamt kann dennoch keine Destabilisierung des Schleifen-Helix-Motivs, sowie eine Umorientierung des aromatischen Clusters festgestellt werden. Im Gegenteil bestätigt die Schmelzpunktbestimmung einen höheren Wert von 2.5 °C gegenüber dem Wildtyp. Beide Aspekte sprechen daher für einen stabilisierenden Effekt durch die eingebrachte Mutation und zeigt die untergeordnete Bedeutung dieser H-Brücke zur Dimerstabilität. Offenbar ist das Vorhandensein eines aromatischen Restes in dieser Position dennoch wichtig, denn das Schleifen-Helix-Motiv nimmt bis auf Ala48' die identische Position ein. Der hydrophobe Kontakt des Phenylrings von Phe333 verschiebt den gegenüberliegenden Carbonylsauerstoff von Ala48' um weniger als 1 Å von seiner ursprünglichen Position. Dennoch bildet der hydrophobe Kontakt in seiner Gesamtheit eine stabile Anordnung des Schleifen-Helix-Motivs, da der zugängliche Raum des Schleifen-Helix-Motivs dadurch wohlmöglich eingegrenzt wird. Dies steht in Einklang mit der erhöhten Schmelztemperatur.

Eine weitere Mutation war die Einführung von TGT-H333A, bei der die Wechselwirkung der N_εH-Gruppe von Histidin mit dem Carbonylsauerstoff von Ala48' und den aromatischen Baustein vollständig entfernt wurde. Dennoch hat der H333A-Austausch ebenfalls keinen großen Einfluss auf die Dimer-Grenzfläche. Der aromatische Cluster nimmt die gewohnte Anordnung ein. Die fehlende Interaktion zwischen dem ehemaligen His333 zum Schleifen-Helix-Motiv führt lediglich zur Beeinträchtigung von drei Aminosäuren des Motivs, während die restlichen Aminosäuren vollständig in der gleichen Anordnung des Wildtyps verbleiben. Die Messung des Schmelzpunktes ermittelt dennoch eine Erniedrigung von ca. 5 °C, im Vergleich zum Wildtyp-TGT und führt zu einer signifikanten Erhöhung der Monomerkonzentration von 45% bei 10 µM Untereinheitenkonzentration.

Letztlich konnte nur bei einigen TGT-Varianten (W95F und Y330F) bei pH 5.5 eine destabilisierende Wirkung auf die Dimer-Grenzfläche in Verbindung mit einem vollständigen Zusammenbruch des Schleifen-Helix-Motivs erzielt werden. Dieser Befund warf die Frage auf, ob die Protonierung von His333 bei pH 5.5 der Grund für die Schaffung einer elektrostatischen Umgebung ist, die die allgemeine Stabilität des Schleifen-Helix-Motivs stark beeinflusst und so die massiven destabilisierende Effekte auslöst. Der Mechanismus, der diesem Phänomen zugrunde liegt und die mutmaßliche Rolle von His333 für die funktionalen Eigenschaften des Enzyms sind derzeit noch unklar, da die gelösten Kristallstrukturen keine eindeutige Erklärung

liefern. Dennoch zeigt dies die Bedeutung einer ausgewogenen Zusammensetzung hydrophober aromatischer Reste im Cluster, die durch die Einführung einer Ladung leicht gestört werden kann. Bemerkenswert ist, dass die Integrität des Schleifen-Helix-Motivs wiederhergestellt wird, sobald diese Ladung entfernt wird. Umso erstaunlicher ist die Einführung eines Restes wie Alanin, der sich zwar negativ auf die Stabilität des aromatischen Clusters auswirkt aber die intakte Struktur des Schleifen-Helix-Motivs erhält.

Insgesamt konnte kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Enzymkinetik, den Ergebnissen der nativen Massenspektrometrie und den beobachteten Strukturmerkmalen festgestellt werden. Dieses Phänomen wurde bereits in früheren Studien beobachtet.^[38,39] Es ist wahrscheinlich, dass die Anwesenheit eines tRNA-Substrats den Zusammenhalt oder sogar die Bildung des Homodimers stark begünstigt. Die eingeführten Mutationen beeinflussen die Stabilität der Dimer-Grenzfläche in unterschiedlichem Maße, was zuletzt die Substratstabilisierung der tRNA im Protein moduliert und somit Einfluss auf die Enzymkinetik nimmt. Es liegt auf der Hand, dass der Einfluss der tRNA auf die quaternäre Struktur von TGT in Zukunft Gegenstand gründlicher Untersuchungen sein muss.

Aus kristallographischer Sicht ist es zunächst überraschend, dass alle Varianten und noch mehr im Falle der destabilisierenden Mutationen, das immer wieder die bekannte Dimerform im Kristall beibehalten wird. Die Tendenz zur Dimerisierung in Abhängigkeit der Proteinkonzentration konnte bereits durch frühere Experimente mit nativer nanoESI-Massenspektrometrie beobachtet werden.^[39] Daher scheint die Kristallisation allgemein nachteilig für die Erhaltung einer Monomerstruktur im festen Zustand zu sein, da durch die Aufkonzentration während der Kristallisation zu hoher lokaler Proteinkonzentration führt und sich so das Monomer/Dimer-Gleichgewicht deutlich in Richtung des Dimers verschiebt. Trotz Zerfall des Schleifen-Helix-Motivs bei einigen Proteinvarianten wird immer wieder die in der C2 gefundenen Molekül- und Kristallpackung des für den Wildtyp beobachtet starken Protein-Protein-Kontakts in einen abgeschwächten Dimerkontakt umgewandelt. Es ist daher möglich, dass bei allen destabilisierten Proteinvarianten die C2-Anordnung trotz allem die effizienteste Packung darstellt. Nichtsdestotrotz zeigen aktuelle Strukturstudien (**Kapitel 2**), dass das Schleifen-Helix-Motiv eine hohe Verformbarkeit aufweist, was wahrscheinlich für die Dimer-Regulierung und -bildung wichtig ist. Daher ist die gezielte Modulation des formbaren Schleifen-Helix-Motivs in eine Geometrie, die nicht mehr geeignet ist, einen starken Dimer-Grenzflächenkontakt herzustellen, der Schlüssel zur Störung und letztendlich zur Verhinderung der Dimerbildung zu sein. Dies könnte durch Liganden erreicht werden, die das Motiv in einer Geometrie stabilisieren, die mit dem entgegengesetzten Dimer aus Gründen der Komplementarität nicht kompatibel ist oder die das Motiv durch Desorientierung stark beeinträchtigt.

5.6 Methoden

Die verwendeten Materialien, Chemikalien, Laborgeräte und Puffer sind in **Kapitel 6** aufgeführt. Allgemeine Methoden, sofern nicht in diesem Kapitel erwähnt, werden ebenfalls in **Kapitel 6** beschrieben.

5.6.1 Gezielte Mutagenese durch PCR

Die gezielte Mutagenese wird in **6.6.1** detailliert beschrieben.

5.6.2 Proteinexpression und Reinigung

Proteinexpression und -reinigung wurden wie in **3.6.1** beschrieben durchgeführt. Im Unterschied wurden die jeweiligen Hauptkulturen (2 L, LB-Medium, 0.1% (v/v) Ampicillin, 37 °C, 130 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 inkubiert. Die Proteinexpression und Reinigung von Fluor-markierter TGT wird in **2.6.2** ausführlich beschrieben.

5.6.3 Native Massenspektrometrie

Zur Durchführung nativer Massenspektrometrie-Experimente wurde ein hybrider Q-IM-TOF-Massenspektrometer (*Synapt G2*, WATERS) verwendet, dass an ein automatisiertes chipbasiertes Nanoelektrospray-Gerät (*Triversa Nanomate*, ADVION) gekoppelt ist und im Positivmodus arbeitet. Der Druck des Zerstäubergases und die Kapillarspannung wurden auf 0.6 psi bzw. 1.75 kV eingestellt. Der Gegendruck des Instruments wurde auf 6 mbar und die Kegelspannung auf 80 V eingestellt, um die Ionenübertragung zu gewährleisten und die Dissoziation der Dimere zu reduzieren. Die Kalibrierung wurde mit einfach geladenen Ionen durchgeführt, die durch eine 2 mg mL⁻¹-Lösung von Cäsiumiodid in 2-Propanol/Wasser (1:1 v/v) erzeugt wurden. Vor der nativen MS-Analyse wurden alle Enzyme mit Hilfe von Mikrozentrifugengelfiltrationssäulen (*Zeba* 0.5 mL, THERMO SCIENTIFIC) gegen 1 M Ammoniumacetat bei pH 7.5 gepuffert. Die Konzentration der Proteine wurde mit einem *Nanodrop*[™]-Spektralphotometer bestimmt (THERMO SCIENTIFIC). Die Proteine wurden verdünnt, um eine Endkonzentration von 1 und 10 µM zu erhalten, um das Monomer/Dimer-Verhältnis zu untersuchen, oder auf 2.5 µM eingestellt, um die zeitaufgelösten nativen MS-Experimente durchzuführen. In den letzteren Experimenten wurden äquimolare Mischungen von TGT-WT bzw. TGT-H333A mit ihren entsprechenden Streptavidin-markierten Varianten bei einer Konzentration von 2.5 µM verwendet, um die Austauschkinetik der Untereinheiten zu untersuchen. Das Heterodimer/Homodimer-Verhältnis von Streptavidin-markierten und unmarkierten Proteinen wurde aus ihren relativen Massenintensitäten bei verschiedenen Inkuba-

tionszeiten (von 0 sec bis 25 Stunden) berechnet. Die Interpretation der MS-Daten wurde mit MassLynx 4.1 (WATERS) durchgeführt.

5.6.4 Herstellung von tRNA^{Tyr}

Nichtmodifizierte *E. coli* tRNA^{Tyr} (ECY2)^[149] wurde für die kinetischen Analysen mittels *in vitro*-Transkription durch die T7-RNA-Polymerase bereitgestellt. Das Reaktionsgemisch (20 mM MgCl₂, 80 mM HEPES pH 7.5, 1 mM Spermidin, 5 mM DTT, 0.05 U Pyrophosphatase, 30 µg linearisiertes DNA-Templat, 3.75 mM von jedem NTP, 5% DMSO und 1 µM T7-RNA-Polymerase) wurde für 4 h bei 37 °C inkubiert. Das Transkriptionsprodukt wurde unter gleichen Volumenanteile einer Phenol/Chloroformextraktion (pH 4.5) unterzogen und durch Zugabe von 0.1 Volumenanteilen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und 2 Volumenanteilen von Ethanol ausgefällt. Der Überstand wurde durch Zentrifugation (16500 g, 4 °C, 10 min; 1-14K, SIGMA) abgetrennt und das erhaltene Pellet getrocknet. Der Rückstand wurde zur präparativen Denaturierung (8 M Harnstoff) in ddH₂O suspendiert und einer 8%igen Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Die gewünschte RNA-Bande wurde durch UV-Licht identifiziert und mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Über Nacht wurde die tRNA in einem *Thermomixer Comfort* (900 rpm, 4 °C; EPPENDORF) in 1 M Natriumacetat (pH 5.2) aus dem herausgetrennten Gel extrahiert. Wie bereits oben beschrieben, wurde die tRNA mit Ethanol gefällt und anschließend in ddH₂O gelöst. Die Konzentration wurde abschließend mittels UV-Photometrie (λ = 260 nm) unter Verwendung eines *Nanodrop™ 2000c* (THERMO SCIENTIFIC, siehe 6.8.2) bestimmt.

5.6.5 Kristallisation verschiedener *Z. mobilis* TGT-Derivate

TGT-Kristalle wurden unter Verwendung der *Hanging-Drop Vapour Diffusion*-Methode innerhalb weniger Tage bei 18 °C erhalten. Protein-Derivate wurden bei einer Konzentration von 12 mg mL⁻¹ verwendet und in Abhängigkeit vom pH in zwei verschiedenen Kristallisationspuffern untersucht. Hierzu wurde die Kristallisation in pH 5.5 (100 mM MES pH 5.5, 0.5 mM DTT, 10% (v/v) DMSO, 13% (w/v) PEG8000) und 8.5 (100 mM TRIS pH 8.5, 1 mM DTT, 10% (v/v) DMSO, 13% (w/v) PEG8000) durchgeführt. Proteinlösung und Kristallisationspuffer wurden im gleichen Volumenanteil (je 1 µL) auf ein Deckglas zusammengegeben und gegebenenfalls durch leichte Variation des Volumenverhältnisses zueinander optimiert. Weitere Verbesserungen konnten in Kombination durch Erniedrigung der Protein- oder PEG8000-Konzentration weiterhin erzielt werden. Im Fall von H333A^{5.5} konnten zufriedenstellende Kristalle nur durch *Streak Seeding* erhalten werden. Reservoirvertiefungen wurden mit 650 µL des Kristallisationspuffers befüllt und die Deckgläser mit Hilfe von Silikonfett versiegelt.

5.6.6 Datensammlung und Prozessierung

Datensätze der Kristallstrukturen (Tabelle S 5.2) wurden am Elektronenspeicherring BESSY II (Helmholtz-Zentrum Berlin, Deutschland) an der *Beamline* 14.1 mit einem DECTRIS *Pilatus 6M* Detektor bei einer Wellenlänge von 0.9184 Å oder am *IµS Microfocus Source* (INCOATEC) mit einem *mar345* Detektor (MARXPERTS) bei einer Wellenlänge von 1.5418 Å und 100 K aufgenommen. Vor der Datenerfassung wurden die Kristalle für einige Sekunden in den Cryo-Puffer A überführt und im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Erhaltene Diffraktionsbilder wurden mit Hilfe von *XDS*^[79] indiziert, prozessiert und skaliert. Die Überführung der Reflektionsdatei *XDS_ASCII.HKL* in das MTZ-Format wurde mit *XDSCONV* durchgeführt und eine Teilmenge von zufällig ausgewählten 5% aller Reflexe zur *R_{free}*-Wert Berechnung verwendet. Alle in diesem Projekt erhaltenen Datensätze wurden in der monoklinen Raumgruppe *C2* prozessiert mit einem TGT-Monomer pro asymmetrische Einheit und enthielten einen Matthews-Koeffizienten von 2.3 oder 2.4 Å³ Da⁻¹.

5.6.7 Strukturbestimmung, Verfeinerung und Analyse

Die Phasen der Kristallstrukturen wurde durch die Anwendung des molekularen Ersatzes mit Hilfe des Moduls *Phaser*^[80] aus *CCP4*^[81] bestimmt. Als Suchmodell diente die in der PDB Bank hinterlegte Kristallstruktur mit dem Code 1PUD^[32]. Zwischen den Verfeinerungszyklen mit *phenix-refine* (1.16_3549)^[82] wurde *Coot*^[83] zur Modellbuanpassung verwendet. *Simulated Annealing* mit Standard Einstellungen wurden zunächst durchgeführt, gefolgt von weiteren Zyklen mit *Coorindate xyz*, *Occupancy*. *B*-Werte wurden in den Datensätzen **H333A**^{5.5} und **H333F**^{5.5} isotrop verfeinert, wobei in **H333F**^{5.5} zudem TLS (*Translation, Liberation, Screw*; Auswahl durch implementierte Funktion in Phenix (1.16_3549)) angewandt wurde. In den Datensätzen **W326F**_{5FW}^{5.5}, **Y330F**^{5.5} und **Y330F**^{8.5} wurden die Proteinketten anisotrop verfeinert, wohingegen Wasser und Lösungsmoleküle isotrop behandelt wurden. Zuletzt wurden alle Atome in **H333F**^{8.5}, **W95F**_{5FW}^{5.5}, **W95F**_{5FW}^{8.5} und **TGT**_{5FW}^{5.5} anisotrop verfeinert. Strukturen mit anisotroper Verfeinerung wurden anschließend mit Wasserstoffen als *riding hydrogens* versetzt, jedoch Wasserstoffe von auftretenden Lösungsmittelmolekülen entfernt. Alternative Seitenkettenkonformationen, fehlende Aminosäuren, Wassermoleküle wurden in wohldefinierte mF_o-DF_c-Elektronendichte eingebaut und während der Verfeinerung beibehalten, wenn sie in der 2F_o-F_c-Elektronendichte wiedergefunden wurden und die Besetzung größer als 20% war. Nur Wassermoleküle, die nach der Verfeinerung eine 2F_o-F_c Elektronendichte von $\sigma < 1.0$ RMSD, einen *B*-Faktor nicht signifikant größer als 55 Å² und Abstände zwischen 2.3 Å und 3.5 Å zu umgebenden Atomen aufwiesen, wurden in der Struktur beibehalten. Die grafische Darstellung der Kristallstruktur-Koordinaten und Elektronendichte-Karten erfolgte mit *Chimera*^[84].

5.6.8 Enzymkinetische Untersuchung unter Verwendung des Radioaktivassays

Die Wechselzahl (k_{cat}) und Michaelis-Menten-Konstante (K_m , tRNA^{Tyr}) der *Z. mobilis* TGT-Varianten wurde durch die Einführung von $[8\text{-}^3\text{H}]$ -Guanin in die *E. coli* tRNA bestimmt. Das $[8\text{-}^3\text{H}]$ Guanin wurde bei 37 °C mit einer konstanten Proteinkonzentration bei 150 nM im Assay-Puffer eingebaut. Die verwendete Konzentration von $[^3\text{H}]$ -markiertem Guanin wurde in allen Messungen bei 10 μM gehalten, wohingegen die tRNA^{Tyr} Konzentration zwischen 0.26 μM und 15 μM variiert wurde.

TGT-Probe und Assay-Puffer mit tRNA^{Tyr} wurden für 37 °C inkubiert, bevor sie vereint wurden. Im Intervall zwischen 4 und 16 min wurden vier Aliquote (15 μL) entnommen und auf ein Glasfilterplättchen (*GC-F*, WHATMAN) pipettiert. Die katalytische Aktivität der Enzyme wurde durch die Platzierung der Glasfilterplättchen in eisgekühlte TCA 10%-Lösung (Trichlor-essigsäure) gestoppt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde durch zweimaliges Waschen mit TCA 5%-Lösung für je 10 min und einer 20 minütigen Waschung mit 96%igen Ethanol nicht-inkorporiertes $[8\text{-}^3\text{H}]$ -Guanin in die tRNA aus dem Plättchen entfernt. Die Filterplättchen wurden für eine Stunde bei 60 °C getrocknet und mit 4 mL *Rotizint[™]eco plus* (ROTH) versetzt. Die quantitative Auswertung wurde mit Hilfe des Szintillationszähler *Tri-Carb[®] 2810 TR* (PERKINELMER) durchgeführt. Die kinetischen Parameter wurden mit dem Programm *GraphPad PRISM* (7.04) berechnet.^[47]

5.6.9 Thermal-Shift-Assay

Um die Stabilität des Proteins in Abhängigkeit von Modifikationen des Proteins durch Mutation oder Einführung nicht proteinogener zu bestimmen, wurde der Schmelzpunkt des Proteins mittels *Thermal-Shift*-Assay bestimmt. Alle Messungen wurden am *QuantStudio 3* (APPLIED BIOSYSTEMS) durchgeführt.

In der Optimierungsphase wurden Proteinkonzentration (12 mg mL⁻¹ in Hochsalz-Puffer) und *SYPRO[™] Orange* (5000x konzentriert in DMSO, INVITROGEN) gegeneinander variiert um geeignete Bedingungen zu finden. Tabelle 5.2 gibt die verwendeten Konzentrationen von *SYPRO[™] Orange* wieder. Hierzu wurden 1 oder 2 μL der Proteinlösung mit 19 μL des Farbstoffs auf eine 96-Well-PCR-Platte (*MicroAmp[™] Fast 96-Well Reaction Plate (0.1 mL)*, APPLIED BIOSYSTEMS) zusammengegeben und anschließend die Platte mit einer geeigneten Folie (*MicroAmp[™] Optical Adhesive Film*, APPLIED BIOSYSTEMS) verschlossen. Für jede Reaktionsbedingung wurde eine Dreifachmessung durchgeführt. Optimale Bedingungen konnten mit 2 μL Protein mit einer zweifachen Konzentration an Farbstoff erzielt werden.

Tabelle 5.2 Getestete Konzentrationen von *SYPRO™ Orange* (5000x konzentriert in DMSO) in der Optimierungsphase.

Assay Mix	2x	1x	0.5x	1/6x
Hochsalz-Puffer	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL
<i>SYPRO™ Orange</i>	2.4 µL	1.2 µL	0.6 µL	0.2 µL
DMSO	-	-	0.6 µL	1.0 µL

Zur Bestimmung der Schmelzkurven während der Optimierungsphase und anschließende Messungen wurde ein Erwärmungsprozess mit 320 Zyklen verwendet, um die Fluoreszenz zwischen 10 °C und 100 °C zu messen. Die Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet. Dabei wurde der Wendepunkt in der Auftragung der Fluoreszenz gegen die Temperatur bestimmt, indem das Minimum der ersten Ableitung ermittelt wurde.

5.7 PDB Zugangscodes

Koordinaten, sowie Strukturfaktoren von TGT^{pH} Varianten wurden in der *RCSB Protein Data Bank* (PDB) mit den Zugangscodes **H333A**^{5.5} (6YRY), **H333F**^{5.5} (6Z0D), **H333F**^{8.5} (6YFW), **Y330F**^{5.5} (6YFX), **Y330F**^{8.5} (6YGK), **W95F**_{5FW}^{5.5} (6YGM), **W95F**_{5FW}^{8.5} (6YGO), **W326F**_{5FW}^{5.5} (6YGL) und **TGT**_{5FW}^{5.5} (6YGP) hinterlegt. Die Kristallstruktur **H333A**^{8.5} (6H7C) wurde von TRAN XUAN PHONG NGUYEN bearbeitet und in der PDB hinterlegt.

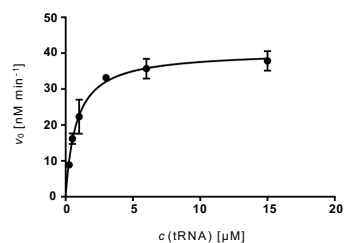
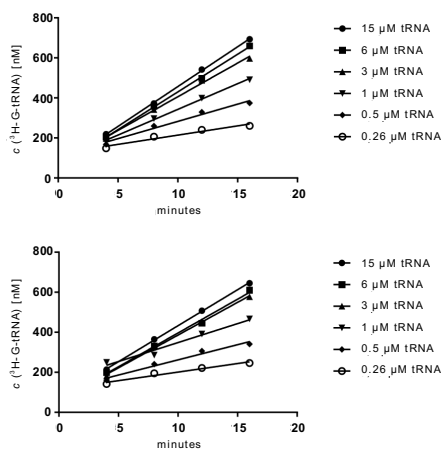
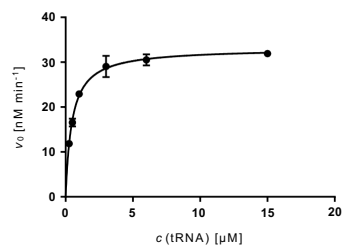
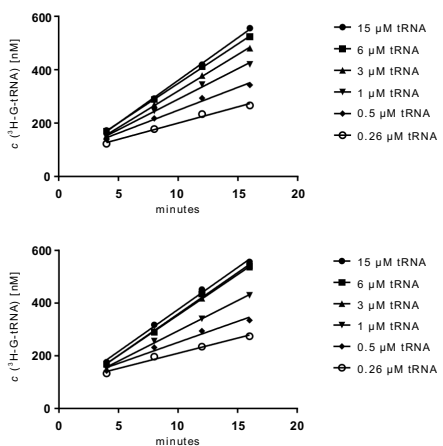
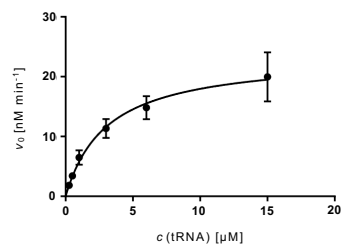
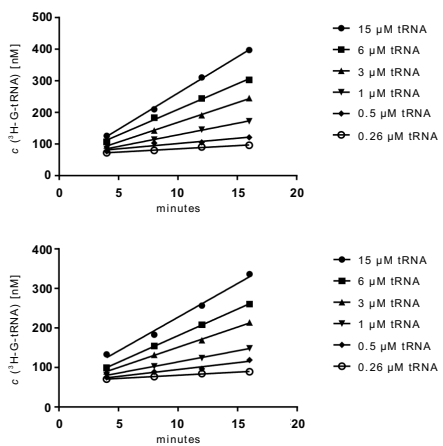
5.8 Generelle Informationen

5.8.1 Enzymkinetik nach Michaelis-Menten

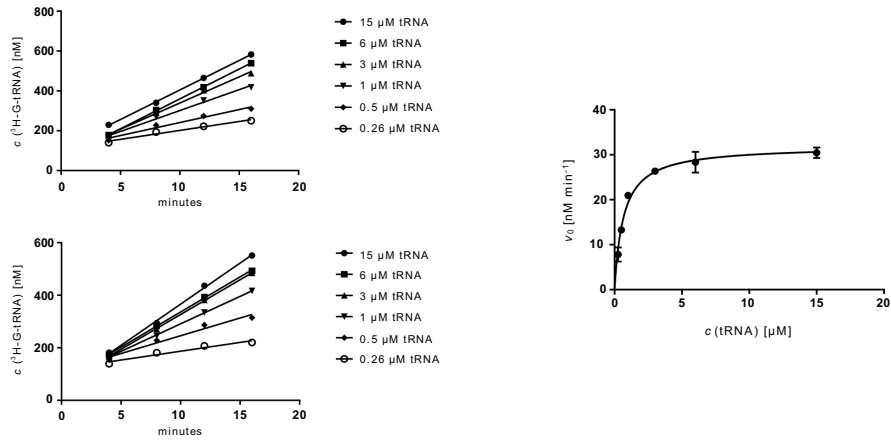
Tabelle S 5.1 Kinetik-Daten der TGT-Varianten.

Protein Variante	K_m (tRNA ^{Tyr}) [µM]	k_{cat} [10 ⁻³ s ⁻¹]
Wildtyp TGT	0.8 ± 0.1	9.0 ± 0.3
Wildtyp TGT _{5FW}	0.5 ± 0.1	7.4 ± 0.2
TGT _{5FW} W95F	3.1 ± 0.7	5.2 ± 0.5
TGT _{5FW} W326F	0.7 ± 0.1	7.1 ± 0.2
TGT Y330F	0.5 ± 0.1	3.0 ± 0.1
TGT H333A	2.0 ± 0.3	6.7 ± 0.3
TGT H333F	0.2 ± 0.0	1.7 ± 0.0

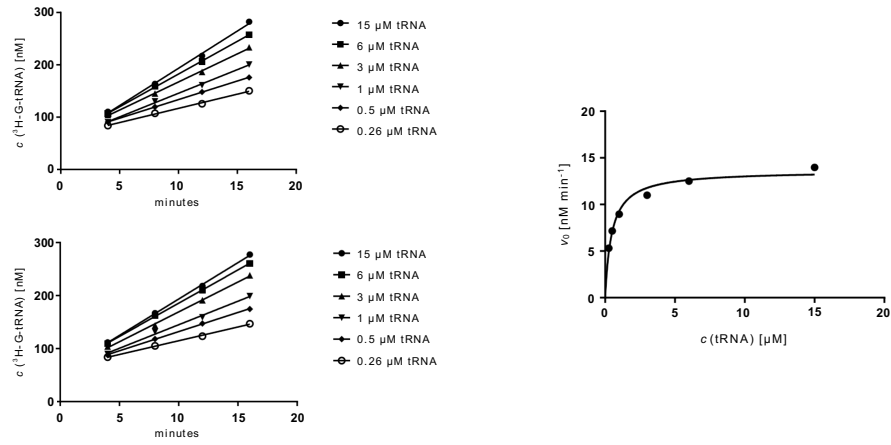
Wildtyp TGT

Wildtyp TGT_{5FW}TGT_{5FW} W95F

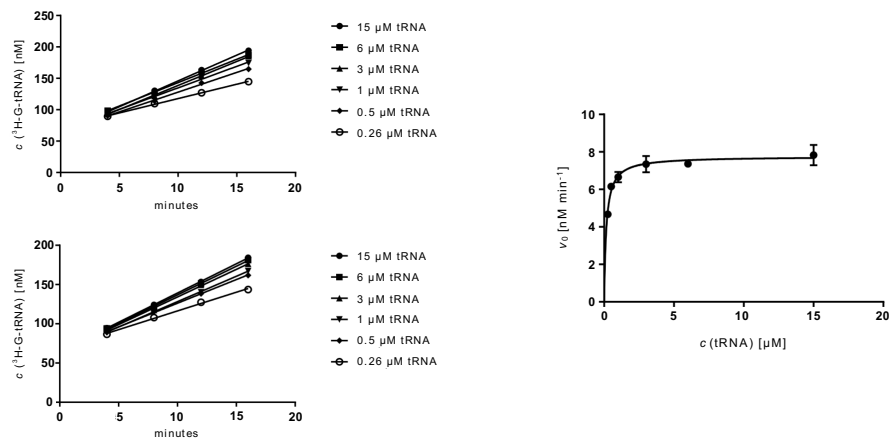
TGT_{5FW} W326F



TGT Y330F



TGT H333F



TGT H333A

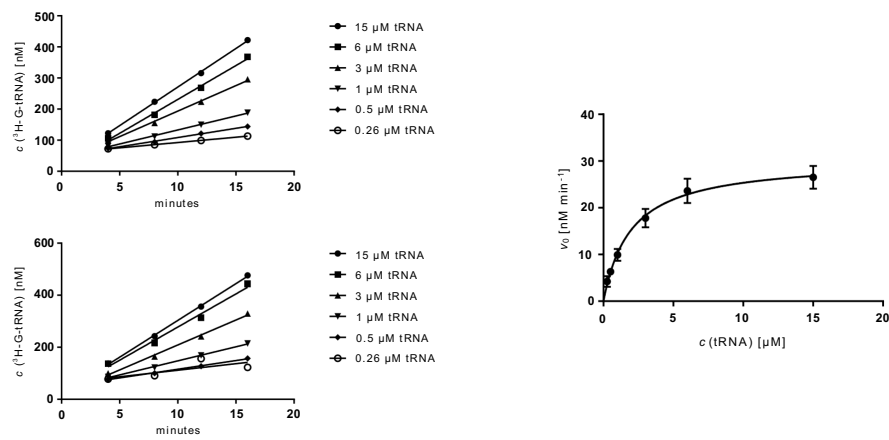


Abbildung S 5.1 Verlaufskurven der Enzymkinetik Messungen und die daraus resultierende Michaelis-Menten-Plots von *Z. mobilis* TGT und mutierten TGT-Varianten. Die Diagramme wurden mit dem Programm *GraphPad PRISM* (7.04) erstellt.

5.8.2 Kristallographische Tabelle

Tabelle S 5.2 Datensammlung und Verfeinerungsstatistik für die Kristallstrukturen verschiedener TGT-Varianten. TGT_{5FW} bezeichnet Strukturen, die mit 5FTrp anstatt regulärem Trp (WT) markiert sind.

TGT _{WT/5FW} ^{pH}	TGT _{5FW} ^{5.5}	H333A ^{5.5}	H333A ^{8.5}	H333F ^{5.5}
PDB ID	6YGP	6YRY	6H7C	6Z0D
(A) Data collection and processing				
Collection site	BESSY 14.1	Incoatec ipS	BESSY 14.2	Incoatec ipS
No. crystals used	1	1	1	1
Wavelength λ [Å]	0.91841	1.5418	0.91841	1.5418
Space group	C2	C2	C2	C2
Unit cell parameters				
a [Å]	90.8	90.3	91.3	90.8
b [Å]	65.1	65.2	65.0	65.3
c [Å]	70.6	70.9	70.5	70.6
β [°]	96.1	96.5	95.9	96.3
(B) Diffraction data				
Resolution range [Å]	45.16 – 1.33 (1.41 – 1.33)	44.87 – 1.82 (1.93 – 1.82)	35.00 – 1.68 (1.72 – 1.68)	40.00 – 1.65 (1.75 – 1.65)
Unique reflections	90420 13633	35506 (5627)	46188 (2556)	47815 (6664)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	3.2 (36.7)	7.1 (48.7)	6.8 (31.7)	3.6 (13.2)
Completeness [%]	96.2 (90.3)	97.1 (95.7)	98.8 (94.4)	96.7 (83.9)
Redundancy	3.1 (2.9)	2.9 (2.8)	3.0 (2.8)	3.6 (3.3)
$I/\sigma(I)$	17.0 (2.4)	9.4 (2.7)	13.0 (3.5)	22.3 (7.7)
Wilson B-factor [Å ²]	15.7	23.4	16.4	15.2
Matthews Coefficient [Å ³ ·Da ⁻¹] ^[a]	2.4	2.4	2.5	2.4
Solvent content [%] ^[a]	49.0	49.1	50.0	49.2
Molecules in asymmetric unit	1	1	1	1
(C) Refinement with Phenix				
PHENIX version	1.16_3549	1.16_3549	1.16_3549	1.16_3549
Resolution range [Å]	45.2 – 1.33	44.9 – 1.82	26.5 – 1.68	43.6 – 1.65
Reflections used for R_{free}	4521	1776	2343	2391
Reflections used for R_{work}	85899	33730	46188	45424
Final R values				
R_{free} [%]	14.8	20.4	18.4	19.4
R_{work} [%]	12.1	17.5	16.0	16.4
No. of atoms (non-hydrogen)				
Protein atoms	2909	2788	2790	2867
Water molecules	377	274	270	380
Ligand atoms	-	-	-	-
RMSD from ideality				
Bond angles [°]	1.0	0.8	0.9	0.8
Bond length [Å]	0.007	0.006	0.007	0.006
Ramachandran plot^[b]				
Most favoured regions [%]	95.8	95.4	96.5	94.4
Additionally allowed regions [%]	3.8	4.2	3.2	5.2
Generously allowed regions [%]	0.3	0.3	0.3	0.3
Mean B-factors [Å²]^[c]				
Protein atoms	21.2	25.8	20.9	19.0
Water molecules	35.5	33.4	32.8	29.4
Ligand atoms	-	-	-	-

TGT _{WT/5FW} ^{pH} PDB ID	H333F ^{8.5} 6YFW	Y330F ^{5.5} 6YFX	Y330F ^{8.5} 6YGK	W95F _{5FW} ^{5.5} 6YGM
(A) Data collection and processing				
Collection site	BESSY 14.1	BESSY 14.1	BESSY 14.1	BESSY 14.1
No. crystals used	1	1	1	1
Wavelength λ [Å]	0.91841	0.91841	0.91841	0.91841
Space group	C2	C2	C2	C2
Unit cell parameters				
a [Å]	90.6	84.6	90.8	84.5
b [Å]	65.0	65.1	65.0	65.0
c [Å]	70.5	71.4	70.3	71.3
β [°]	95.9	93.7	96.0	94.0
(B) Diffraction data				
Resolution range [Å]	45.06 – 1.26 (1.34 – 1.26)	42.56 – 1.38 (1.46 – 1.38)	45.17 – 1.41 (1.48 – 1.40)	42.56 – 1.23 (1.31 – 1.23)
Unique reflections	106808 17052	79276 12689	77939 11334	107419 16748
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	4.6 (45.3)	5.0 (49.7)	3.5 (35.7)	3.8 (49.9)
Completeness [%]	98.0 (97.2)	98.9 (98.5)	97.1 (87.9)	97.5 (94.6)
Redundancy	3.0 (3.0)	4.3 (4.3)	3.3 (3.0)	3.8 (3.7)
$I/\sigma(I)$	11.9 (2.0)	14.9 (2.5)	18.0 (2.7)	16.1 (2.4)
Wilson B-factor [Å ²]	14.1	15.7	15.0	14.3
Matthews Coefficient [Å ³ ·Da ⁻¹] ^[a]	2.4	2.3	2.4	2.3
Solvent content [%] ^[a]	48.8	46.1	48.8	45.8
Molecules in asymmetric unit	1	1	1	1
(C) Refinement with Phenix				
PHENIX version	1.16_3549	1.16_3549	1.16_3549	1.16_3549
Resolution range [Å]	43.4 – 1.26	42.6 – 1.38	43.4 – 1.40	42.2 – 1.23
Reflections used for R_{free}	5341	3964	3897	5371
Reflections used for R_{work}	101466	75312	74042	102047
Final R values				
R_{free} [%]	15.4	16.3	15.4	16.0
R_{work} [%]	13.0	14.1	12.9	13.6
No. of atoms (non-hydrogen)				
Protein atoms	2984	2784	2968	2786
Water molecules	361	279	357	334
Ligand atoms	-	-	0	0
RMSD from ideality				
Bond angles [°]	1.0	0.9	0.9	0.9
Bond length [Å]	0.007	0.007	0.007	0.007
Ramachandran plot^[b]				
Most favoured regions [%]	95.9	94.7	94.7	95.7
Additionally allowed regions [%]	3.8	5.0	5.0	4.0
Generously allowed regions [%]	0.3	0.3	0.3	0.3
Mean B-factors [Å²]^[c]				
Protein atoms	19.5	22.3	20.4	21.4
Water molecules	33.2	32.0	31.2	35.0
Ligand atoms	-	-	-	-

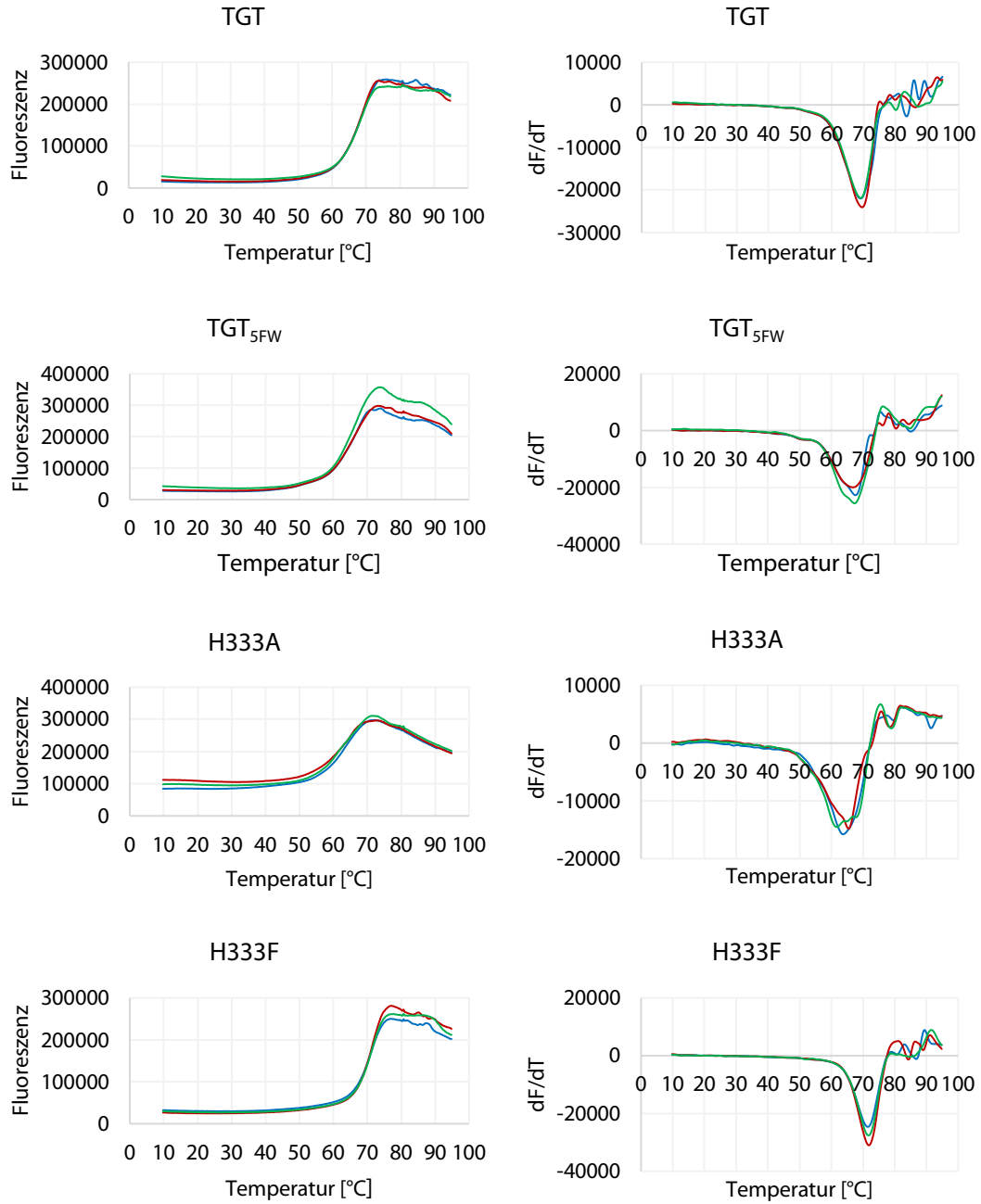
TGT _{WT/5FW} ^{pH} PDB ID	W95F _{5FW} ^{8.5} 6YGO	W326F _{5FW} ^{5.5} 6YGL
(A) Data collection and processing		
Collection site	BESSY 14.1	BESSY 14.1
No. crystals used	1	1
Wavelength λ [Å]	0.91841	0.91841
Space group	C2	C2
Unit cell parameters		
a [Å]	90.4	91.1
b [Å]	64.3	65.2
c [Å]	70.8	70.7
β [°]	96.0	96.1
(B) Diffraction data		
Resolution range [Å]	45.17 – 1.26 (1.34 – 1.26)	45.31 – 1.48 (1.57 – 1.48)
Unique reflections	109116 17332	66504 10258
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	4.5 (49.3)	3.9 (43.6)
Completeness [%]	98.7 (97.2)	97.4 (93.4)
Redundancy	3.7 (3.6)	2.8 (2.7)
$I/\sigma(I)$	14.2 (2.1)	15.1 (2.0)
Wilson B-factor [Å ²]	14.1	18.1
Matthews Coefficient [Å ³ ·Da ⁻¹] ^[a]	2.4	2.4
Solvent content [%] ^[a]	49.0	49.3
Molecules in asymmetric unit	1	1
(C) Refinement with Phenix		
PHENIX version	1.16_3549	1.16_3549
Resolution range [Å]	43.5 – 1.26	43.4 – 1.48
Reflections used for R_{free}	5456	3326
Reflections used for R_{work}	103658	63177
Final R values		
R_{free} [%]	14.5	16.4
R_{work} [%]	12.2	13.2
No. of atoms (non-hydrogen)		
Protein atoms	2965	2860
Water molecules	354	351
Ligand atoms	0	0
RMSD from ideality		
Bond angles [°]	1.0	1.0
Bond length [Å]	0.007	0.007
Ramachandran plot^[b]		
Most favoured regions [%]	95.0	95.8
Additionally allowed regions [%]	4.7	3.8
Generously allowed regions [%]	0.3	0.3
Mean B-factors [Å²]^[c]		
Protein atoms	20.1	24.0
Water molecules	34.4	33.8
Ligand atoms	-	-

Die Schale mit der höchsten Auflösung wird durch Werte in Klammern beschrieben. ^[a]Matthews coefficient und solvent content wurden mit dem Programm *Matthews_coef* aus der CCP4-Reihe (8.4) berechnet.^[81]

^[b]Ramachandran-Plots wurden mit *PROCHECK*^[85] und ^[c]mittlere B-Faktoren wurden mit *MOLEMAN*^[86] berechnet.

5.8.3 *Thermal-Shift-Assay*

Rohspektren TSA und deren 1. Ableitung



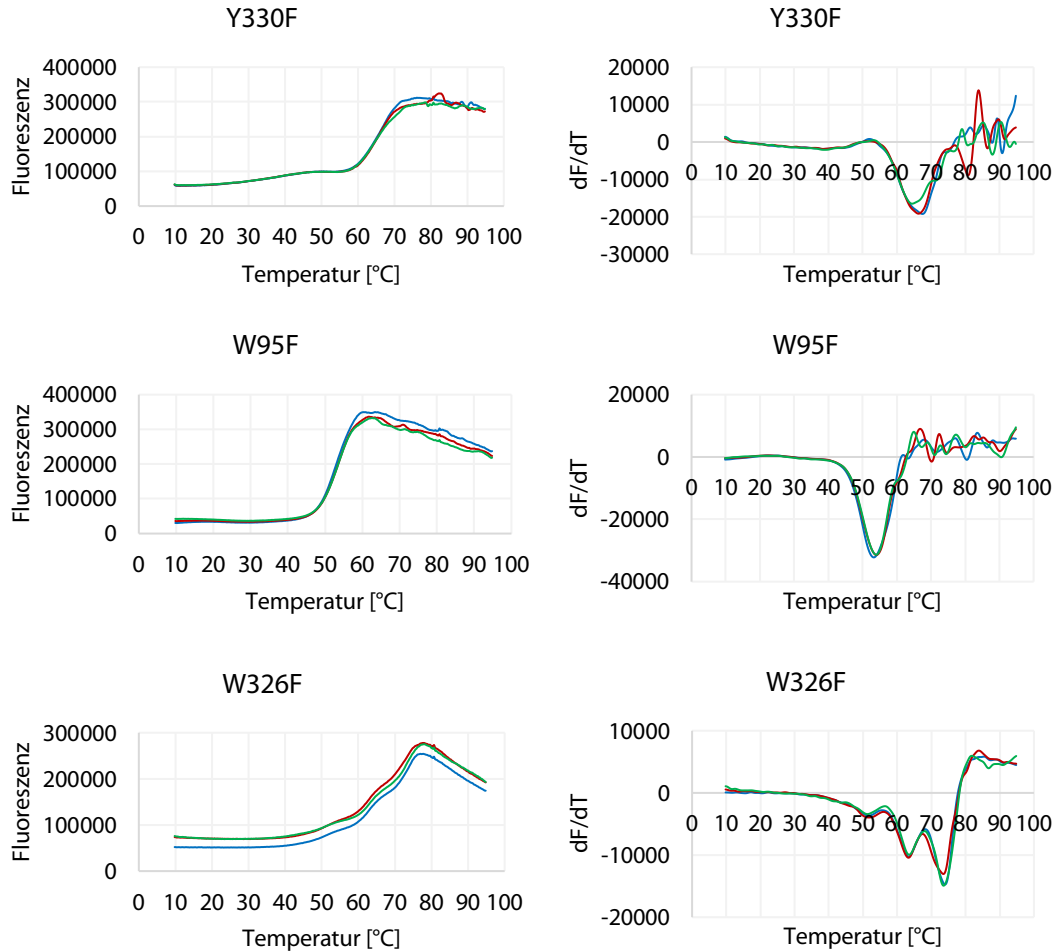


Abbildung S 5.2 Links: Schmelzkurven verschiedener TGT-Derivate im *Thermal-Shift*-Assay. Aufgetragen ist die gemessene Fluoreszenz in Hochsalz-Puffer gegen die Temperatur. Die Fluoreszenz entsteht durch die Zugabe des fluoreszenten Farbstoffs *SYPRO™ Orange*, der an hydrophobe Aminosäuren bindet. **Rechts:** Auftragung der ersten Ableitung einer Schmelzkurve gegen die Temperatur. Das Minimum entspricht dem Schmelzpunkt des Proteins, das in der Schmelzkurve vermessen wurde.

6

Kapitel 6

Material und allgemeine Methoden

Allgemeines

Die experimentellen Arbeiten im Labor wurden im Laborbereich S1 unter Einhaltung der vorgegebenen Sicherheitsstufen gemäß Gentechnikgesetz und Bioverordnung durchgeführt. Für Arbeiten unter sterilen Bedingungen wurden Arbeitsgeräte, Medien und Chemikalien vor Gebrauch sterilisiert (121 °C, 2.5 bar, 20 min; FVA/2, FEDEGARI) und in einer sterilen Umgebung gehandhabt (*Herasafe KS15*, THERMO SCIENTIFIC). Genutztes Wasser wurde vor der Verwendung durch einen Ionenaustauscher entmineralisiert.

6.1 Laborgeräte

Laborgerät

913 pH Meter
 Akku-betriebene Pipettierhilfe pipetus®
 ÄKTA FPLC
 ÄKTA prime plus
 Autoklav FVA/2
 Blockthermostat TCR 100
 Stromversorgung EC250-90
 Feinwaage CP2P
 Halogen-Stromversorgung TH3
 Inkubator Schüttler Innova 4200
 Inkubator Schüttler Innova 4230
 Magnetrührer MR Hei-Standard
 Magnetrührer RH basic 2
 Microcal ITC₂₀₀
 Mikroskop SZ 60
 Mini-Membran-Vakuumpumpe N811KN.18
 Mini-Zentrifuge mini G
 Mini-Zentrifuge ROTILABO®
 Mini-Inkubator I 5110-230V
 Peristaltikpumpe Pump P-1
 Pipetten
 Plattformschüttler Polymax 1040
 PTC-150 MiniCycler™
 PURELAB® flex 2
 Quants-Studio 3
 Rotor JA-10
 Rotor JA-25.50
 SDS-PAGE Mini-Protean® Tetra System
 Sonifier 250
 Spektralphotometer Nanodrop™ 2000c
 Sterilbank HERAsafe® KS15
 Szintillationszähler Tri-Carb® 2810
 Thermomixer comfort
 Tischzentrifuge 1-14K
 Trockenschrank UF160
 Ultraschallbad Transsonic T310

Hersteller

METROHM
 HIRSCHMANN
 GE HEALTHCARE
 GE HEALTHCARE
 FEDEGARI
 ROTH
 E-C APPARATUS CORPORATION
 SARTORIUS
 OLYMPUS
 NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
 NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
 HEIDOLPH
 IKA
 GE HEALTHCARE
 OLYMPUS
 KNF
 IKA
 ROTH
 LABNET
 PHARMACIA FINE CHEMICALS
 EPPENDORF
 HEIDOLPH
 MJ RESEARCH
 ELGA
 APPLIED BIOSYSTEMS
 BECKMAN COULTER
 BECKMAN COULTER
 BIO RAD
 BRANSON
 THERMO SCIENTIFIC
 THERMO SCIENTIFIC
 PERKINELMER
 EPPENDORF
 SIGMA
 MEMMERT
 ELMA

Vortex-Schüttler VF2	JANKE & KUNKEL
Vortex-Schüttler RS-VA10	PHOENIX
Waage PCB	KERN
Waage SBC 32	SCALTEC
Waage SBC 62	SCALTEC
Zentrifuge Avanti J-25	BECKMAN COULTER
Zentrifuge Multifuge 3SR	HERAEUS

6.2 Chemikalien und verwendete Materialien

Alle aufgelisteten Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung genutzt.

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid (30%)	ROTH
Agar-Agar, bakteriologisch	ROTH
Agarose	FLUKA
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (TRIS)	ROTH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	ROTH
Ammoniumsulfat	ROTH
Ampicillin	ROTH
AutoSeq™ G-50 Dye Terminator	GE HEALTHCARE
Biotin	IBA
Brillant Blau R250	ROTH
Caseinhydrolysat, bakteriologisch	ROTH
Chloroform	SIGMA
cOmplete™ mini, EDTA-free protease inhibitor Cocktail	ROCHE
Coomassie Brilliant Blue R250	MERCK
Dikaliumhydrogenphosphat	ROTH
Dimethylformamid	FISHER SCIENTIFIC
Dimethylsulfoxid (≥99,5%)	ROTH
1,4-Dithiothreitol (DTT)	ROTH
Essigsäure (100%)	ROTH
Ethanol (96%)	ROTH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	ROTH
5-Fluor-DL-Tryptophan (95-99%)	SIGMA/FLUOROCHEM
Glucose	FISHER SCIENTIFIC
Glycerol	ACROS ORGANICS
[8- ³ H]-Guanin	HARTMANN ANALYTICS
Guanin - Hydrochlorid	SIGMA
Hanging Drop Crystallization Plate	HAMPTON RESEARCH
Harnstoff	ROTH
Hefeextrakt	ROTH
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	ROTH
illustra™ AutoSeq™ Dye Terminator Removal Kit	GE HEALTHCARE
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	ROTH
Kaliumdihydrogenphosphat	ROTH
Kaliumthiocyanat	ROTH
Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat	MERCK
Einweg-Küvetten	SARSTEDT
Magnesium(II)-sulfat Heptahydrat	ROTH

Magnesiumchlorid Hexahydrat	MERCK
Methanol	FISHER SCIENTIFIC
MicroAmp™ Fast 96-Well Reaction Plate (0.1 mL)	APPLIED BIOSYSTEMS
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	APPLIED BIOSYSTEMS
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Monohydrat (MES)	ROTH
N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin)	MERCK
Nalgene™ Rapid-Flow™ Porengröße 0.2 µm	THERMO SCIENTIFIC
Natriumacetat	ROTH
Natriumchlorid	FISHER SCIENTIFIC
Natriumhydroxid	ROTH
NTP	ROTH
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (SM0671/2)	FERMENTAS
Phenol	SIGMA
Polyethylen Glykol MW 3359 (PEG3350)	SIGMA
Polyethylen Glykol MW 6000 (PEG6000)	ROTH
Polyethylen Glykol MW 8000 (PEG8000)	ROTH
PureYield™ Plasmid Miniprep Kits	PROMEGA
Q Sepharose™ Fast Flow	AMERSHAM BIOSCIENCE
QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	AGILENT TECHNOLOGIES
Rotiphorese® 10x SDS-PAGE	ROTH
Rotiszint®eco plus	ROTH
Salzsäure rauchend 37%	ROTH
Silikon (GE Bayer Silicones)	BAYER
Strep-Tactin®XT Superflow® High Capacity	IBA
Superdex™ 200 Increase 10/300 GL	GE HEALTHCARE
SYPRO™ Orange	INVITROGEN
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	ROTH
Thiamin - Hydrochlorid	ROTH
Thrombin Cleavage Capture Kit	MERCK
tri-Kaliumcitrat Monohydrat	ROTH
tri-Lithiumcitrat Tetrahydrat	ROTH
Trichloressigsäure (TCA)	FLUKA
Trypton	ROTH
Tween® 20	SIGMA
Vivaspin® Zentrifugal-Konzentrator	SARTORIUS

6.3 Puffer, Lösungen und Medien

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien in demineralisiertem Wasser gelöst. Die Einstellung des pH-Wertes wurde durch das Hinzufügen von Salzsäure oder Natriumhydroxid-Lösung am 913 pH Meter (METROHM) eingestellt. Lösungen sowie Puffer wurden vor Nutzung durch *Millipore Steristop™ Bottle Top Filter* (NALGENE) oder Spritzenfilter (ROTH) mit einer Porengröße von 0.22 µm sterilisiert.

Bezeichnung	Bestandteile
Ampicillin-Lösung	100 mg mL ⁻¹ Ampicillin
APS-Lösung	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
Assay-Puffer	100 mM HEPES pH 7.3, 20 mM MgCl ₂ , 0.037% (v/v) Tween 20

CaCl ₂ -Lösung	10 mM PIPES pH 7, 60 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerol
Coomassie Färber	10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Ethanol, 0.1% (w/v) Brillant Blau R250
Cryo-Puffer A	50 mM MES pH 5.5, 0.5 mM DTT, 0.3 M NaCl, 2% (v/v) DMSO, 4% (w/v) PEG8000, 30% (v/v) Glycerol
Cryo-Puffer B	100 mM TRIS pH 8.5, 4% (w/v) PEG6000, 30% (v/v) Glycerol
Entfärber	10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Ethanol
GPC-Puffer	10 mM TRIS pH 7.8, 150 mM NaCl, 1mM EDTA
Hochsalz Puffer	10 mM Tris pH 7.8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 M NaCl
IPTG-Lösung	1 M IPTG
ITC Puffer A	50 mM HEPES pH 7.8, 200 mM NaCl, 0.037% (v/v) Tween 20
ITC Puffer B	50 mM TRIS pH 7.8, 200 mM NaCl, 0.037% (v/v) Tween 20
ITC Puffer C	50 mM Tricin pH 7.8, 200 mM NaCl, 0.037% (v/v) Tween 20
Kristallisationspuffer A	100 mM MES pH 5.5, 1 mM DTT, 10% (v/v) DMSO, 13% (m/v) PEG8000
Kristallisationspuffer B	100 mM TRIS pH 8.5, 1 mM DTT, 10% (v/v) DMSO, 13% (w/v) PEG8000
Kristallisationspuffer C	100 mM TRIS pH 8.5, 20% (w/v) PEG3350
Laemmli Puffer	250 mM Tris pH 8.3, 2 M Glycerol, 1% (w/v) SDS
LB Medium	10 g L ⁻¹ NaCl, 10 g L ⁻¹ Trypton, 5 g L ⁻¹ Hefeextrakt, autoklaviert
Lysepuffer	20 mM Tris pH 7.8, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 Tabl. pro 100 mL cOmplete™ mini
MgSO ₄ -Lösung	200 mg mL ⁻¹ MgSO ₄
MJ9-Medium	2.5 g L ⁻¹ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 9 g L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , 6 g L ⁻¹ K ₂ HPO ₄ , 0.5 g Natriumacetat, 10 g L ⁻¹ Caseinhydrolysat, 1 mM MgSO ₄ , 0,01 g Thiamin-HCl, 0.01 mM CuSO ₄ , 7.5 g L ⁻¹ Glucose
Puffer A	10 mM Tris pH 7.8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
Puffer B	10 mM Tris pH 7.8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 M NaCl
Puffer E1	100 mM Tris pH 7.8, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 50 mM Biotin
Puffer E2	100 mM Tris pH 7.8, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Biotin
Puffer W1	100 mM Tris pH 7.8, 1 mM EDTA, 1 M NaCl
Puffer W2	100 mM Tris pH 7.8, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl
Sammelgel-Puffer	1 M Tris pH 6.8
SDS-Laufpuffer	250 mM Tris pH 8.3, 2 M Glycin, 1% (w/v) SDS
SDS-Lösung	10% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (4x)	250 mM Tris pH 6.8, 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerol, 0.04% (w/v) Bromphenolblau, 8% (w/v) β-Mercaptoethanol
Trenngel-Puffer	1 M Tris pH 8.8

6.4 Bakterienstämme und Vektoren

Genutzte Plasmide und Bakterien Stämme sind in der folgenden Tabelle abgebildet. Bereits durchgeführte Klonierungen, sowie Mutationen wurden in vorheriger Arbeit von DR. MANUEL NEEB und TRAN XUAN PHONG NGUYEN durchgeführt und freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Variante	Vektor	Wirtszellen	Hersteller
ZM10	pPR-IBA2	BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (STRATAGENE)	[Neeb M., 2014]
ZM10	pPR-IBA2	RF12 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (ADDGENE)	[Nguyen A., 2017]
ZM10-C158S/C281S/ Y330C/H333A	pPR-IBA2	BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (STRATAGENE)	[Nguyen P., 2015]
ZM10-W95F	pPR-IBA2	RF12 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (ADDGENE)	[Nguyen A., 2019]
ZM10-W178F	pPR-IBA2	RF12 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (ADDGENE)	[Nguyen A., 2019]
ZM10-W326F	pPR-IBA2	RF12 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (ADDGENE)	[Nguyen A., 2018]
ZM10-Y330F	pPR-IBA2	BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (STRATAGENE)	[Nguyen A., 2018]
ZM10-H333A	pPR-IBA2	RF12 BL21 CodonPlus (DE3)-RIL (ADDGENE)	[Nguyen A., 2019]
ZM10-H333F	pPR-IBA2	RF12 BL21 CodonPlus (DE3)-RIL (ADDGENE)	[Nguyen A., 2019]

6.5 Primer zur gezielten Mutagenese

Alle Primer wurden von EUROFINS GENOMIC (München) synthetisiert und käuflich erworben. Die gezielte Mutagenese von H333A, H333F und C158S/C281S/Y330C/H333A wurde von TRAN XUAN PHONG NGUYEN durchgeführt.

Oligonukleotid Primer Sequenz 5' - ... -3'

W95F_backward	5'-C GGT CAG AAT CGG ACG ATC AAA ACC CAT AAA GCT ATG C-3'
W95F_forward	5'-G CAT AGC TTT ATG GGT TTT GAT CGT CCG ATT CTG ACC G-3'
W178F_forward	5'-G GAA CGT AGT ATG CGT TTT GCA AAA CGT AGC CG-3'
W178F_reverse	5'-CG GCT ACG TTT TGC AAA ACG CAT ACT ACG TTC C-3'
W326F_backward	5'-GGC ACG GCT AAA TTT CTG ACA AAC TGC-3'
W326F_forward	5'-GCA GTT TGT CAG AAA TTT AGC CGT GCC-3'
Y330F_backward	5'-CG AAT CAG ATG ATG AAT AAA GGC ACG GCT CCA TTT CTG-3'
Y330F_forward	5'-CAG AAA TGG AGC CGT GCC TTT ATT CAT CAT CTG ATT CG-3'

6.6 Molekularbiologische Methoden

6.6.1 Gezielte Mutagenese durch PCR

Um einzelne Aminosäuren des TGT-Proteins zu verändern, wurden innerhalb des *tgt*-Gens einzelne Basen mit dem *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (AGILENT), unter Beachtung der Herstelleranweisungen, durchgeführt. Entsprechend der Basensequenz wurden Vorwärts- und Rückwärtsprimer entworfen, so dass sich das Triplet, das für die auszutauschende Aminosäure kodiert, in der Mitte befand und von mindestens 10 komplementären Template-DNA Nukleotiden flankiert wurde. Die Menge von 125 ng Primer wurde in jeder PCR-Reaktion verwendet und mit der Formel für ssDNA mit 330 ng nmol⁻¹ als durchschnittliches Molekulargewicht eines Nukleotids berechnet (**Formel 6.1**):

$$x \text{ pM Oligo} = \frac{125 \text{ ng}}{333 \text{ ng nmol}^{-1} \cdot \text{Anzahl Nukleotide}} \cdot 1000$$

Formel 6.1

Als Template-DNA diente ein pPR-IBA2-Vektor, der das *tgt*-Gens in voller Länge trug. Die PCR-Reaktionen wurden, wie in nachfolgender Tabelle abgebildet, in insgesamt 50 µL Volumen durchgeführt:

Reaktionslösung			Thermocycling Protokoll		Zyklen
10x QuikChange Lightning Buffer	5.0	µL		T	t
dNTP Mix	1.0	µL	Initiale Denaturierung	95 °C	30 s
QuikSolution Reagent	1.5	µL	Denaturierung	95 °C	30 s
Vorwärtsprimer	125	ng	Primer-Annealing	60 °C	1 min
Rückwärtsprimer	125	ng	Elongation	68 °C	6 min
pPR-IBA2 TGT	50 – 100	ng	Finale Elongation	68 °C	2 min
QuikChange Lightning Enzyme	1.0	µL	Lagerung	4 °C	∞
H ₂ O	ad. 50	µL			

Nach Beendigung des PCR Protokolls wurde in jeder Reaktion 1 U (Enzymeinheit) DpnI Enzym zugesetzt, vorsichtig gemischt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch die Behandlung von DpnI wird die elterliche methylierte Template-DNA verdaut, wodurch in der folgenden Transformation hauptsächlich mutierte Plasmid-DNA in die *E. coli* Zellen eingebracht werden. Kolonien wurden durch die Ausplattierung der behandelten Zellen auf selektivem LB-Gel Nährmedien erhalten. Anschließend wurden Kulturen mit 200 mL selektivem LB-Medium jeweils mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C gezüchtet. Die Plasmid-DNA wurde mit dem *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (PROMEGA) isoliert. Die Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurde photometrisch überprüft und der Erfolg der Mutation durch Sequenzierung durch EUROFINS GENOMIC bestimmt.

6.7 Mikrobiologische Methoden

6.7.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zunächst wurden Zellen in einer Vorkultur (100 mL, LB-Medium, 0.1% (v/v) Ampicillin, 37 °C, 140 rpm) über Nacht gezüchtet. Am folgenden Tag wurden 500 µL der Kultur in eine neue 50 mL Kultur überführt und bis zu einer ungefähren OD₆₀₀ von 0.375 inkubiert. 20 mL der Kultur wurden anschließend in ein Gefäß aliquotiert und für 10 min auf Eis stehen gelassen. Das Gefäß wurde zentrifugiert (*Multifuge 3SR*, HERAEUS, 1600 g, 4 °C, 7 min) und der Überstand entfernt. Das verbliebene Pellet wurde in 4 mL eiskalter CaCl₂-Lösung (60 mM CaCl₂, 15% Glycerol, 10 mM PIPES pH 7) resuspendiert. Letzterer Schritt wurde bei niedriger Geschwindigkeit und Dauer wiederholt (*Multifuge 3SR*, HERAEUS, 1100 g, 4 °C, 5 min) und das Pellet in 4 mL eiskalte CaCl₂-Lösung gegeben und für 30 min inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation (*Multifuge 3SR*, HERAEUS, 1100 g, 4 °C, 5 min) verworfen und das Pellet

in 800 µL eiskalte CaCl₂-Lösung gelöst und anschließend aliquotiert, schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

6.7.2 *Heat-Shock* basierte Transformation

50 µL kompetente der Zellen wurden auf Eiswasser für 10 min aufgetaut. Eine Erwärmung über 0 °C verschlechtert die Transformationseffizienz erheblich. Gereinigtes Plasmid (*PureYield™ Plasmid Miniprep Kits*, PROMEGA) wurde in eine Menge von 100 ng hinzugegeben und das Gemisch für weitere 30 min auf Eiswasser inkubiert. Der *Thermomixer Comfort* (EPPENDORF) wurde währenddessen auf 42 °C, sowie das LB-Gelährmedium auf 37 °C vorgewärmt. Anschließend wurden die kompetenten Zellen für 30 sec bei 42 °C ohne Schütteln im *Thermomixer Comfort 1.5 mL* inkubiert. 650 µL LB-Medium wurde zu den Zellen hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 350 rpm und 37 °C im *Thermomixer Comfort 1.5 mL* gezüchtet. Zur Ausplattierung wurden die Zellen zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 1 min; 1-14K, SIGMA) und 500 µL des Überstands verworfen. Das Zellpellet wurde schließlich im restlichen Medium resuspendiert und auf dem vorgewärmten Gelährmedium ausplattiert. Das Gelährmedium wurde über Nacht im Inkubator (37°C, *Mini-Inkubator I 5110-230V*, LABNET) gelagert.

6.8 Biochemische Methoden

6.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde aus *E. coli*-Zellen isoliert, die über Nacht im LB/Amp-Medium gewachsen sind. Die Plasmidisolierung erfolgte durch alkalische Lyse unter Verwendung des *PureYield™ Plasmid Miniprep Kits* (PROMEGA) nach Herstellerangaben. Kleine Mengen von DNA, die zur Transformation, sowie für Sequenzierungsexperimente (*Eurofins Genomic*) verwendet wurden, wurden aus 5 mL Kultur isoliert und in 50 µL H₂O eluiert.

6.8.2 UV/VIS-Spektroskopie mit *Nanodrop™ 2000c*

Ein *Nanodrop™ 2000c* Spektrophotometer (THERMO FISHER SCIENTIFIC) wurde nach dem Herstellerhandbuch genutzt, um die Menge und Reinheit der Nukleinsäuren, Konzentrationen der Proteine sowie die bakterielle Kulturdichte nach Lambert-Beer'schen Gesetz zu bestimmen.

Bestimmung von Mengen und Reinheit der Gesamt-DNA

Durch die Beschaffenheit der heterozyklischen Ringe der Nukleotide, wird UV-Licht mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm absorbiert. Hierzu wurden 2 µL der Probe auf den Sockel des *Nanodrops™ 2000c*, nach Nullabgleich mit demineralisiertem Wasser, platziert und bei

einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Bei einer Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ und einer Weglänge von 1 cm, besitzt dsDNA eine OD_{260} von 1. Auf dieser Annahme basierend, wird die DNA von der Software automatisch quantifiziert und als ng μL aufgezeichnet. Die Reinheit wird durch das A_{260}/A_{280} Verhältnis bestimmt, wobei $A_{260}/A_{280} = 1.8$ als eine von Kontamination befreite DNA-Probe betrachtet wird. Für weiterführende Experimente wurden DNA-Proben mit A_{260}/A_{280} von 1.8 – 2.0 verwendet.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird mit der Protein-A280-Methode gemessen, die auf gereinigte Proteine anwendbar ist, die die Aminosäuren Trp und Tyr oder Cys-Cys-Disulfidbindungen enthalten und daher eine Absorption bei 280 nm aufweisen. Nach Nullabgleich mit dem Lager-Puffer des jeweiligen Proteins, wurden 2 μL Proteinprobe auf den Sockel des Gerätes platziert und bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient wurde mit dem Tool *ProtParam* (EXPASY) auf der Basis der Protein-Aminosäuresequenz berechnet.

Protein Variante	MW [Da]	Ext. Koeffizient Abs 0.1% [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$] bei A280	$\epsilon \cdot 1000^{-1}$
WT _{5FW}	43085	-	34.72
W95F _{5FW}	43028	-	29.02
W178F _{5FW}	43028	-	29.02
W326F _{5FW}	43028	-	29.02
C158S/C281S/Y330C/H333A	42855	0.763	-
H333A	42948	0.790	-
H333D	42992	0.789	-
H333F	43024	0.788	-
H333L	42990	0.789	-
W95F	42975	0.696	-
W326F	42975	0.661	-
Y330F	42998	0.754	-
WT	43014	0.789	-

Bestimmung der Bakterienkonzentration in Kultur

Die Anzahl der mikrobiellen Zellen wurde durch Messung der Bakterienkulturdichte bei einer Wellenlänge von 600 nm unter Verwendung einer Einweg-Küvette (SARSTEDT) bestimmt. Als Nullabgleich diente demineralisiertes Wasser.

6.8.3 SDS-PAGE

Die Überprüfung der Identität, sowie der Reinheit von Proteinproben wurde mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht. Hierzu wurden 15%ige Trenngele verwendet. 30 μL der Probe wurden zunächst mit 10 μL 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend bei 95 °C für 10 min inkubiert. Nach Zentrifugation der Probe (13000 rpm, 1 min, *I-14K*, SIGMA) wurden

15 µL auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Referenz wurde *PageRuler™ Prestain Protein Ladder* (THERMO SCIENTIFIC FISHER) verwendet.

Die Umsetzung der SDS-Gelelektrophorese wurde in Laemmli-Puffer bei 130 V durchgeführt. Zur Visualisierung der Proteinbanden, wurde das Gel zunächst in *ROTI®Blue*-Lösung (ROTH) über Nacht gelagert und anschließend die Hintergrundfarbe durch Entfärbelösung entfernt.

Komponente	Sammelgel(2x)	Trenngel(2x)
Acrylamid (30%)	1 mL	3 mL
APS Lösung	60 µL	60 µL
TEMED	6 µL	6 µL
Sammelgel/Trenngel Puffer	1.2 mL	2 mL
SDS-Lösung	60 µL	60 µL
H ₂ O	3.75 mL	0.95 mL

6.8.4 Bestimmung der intakten Proteinmasse, denaturierend

Abhängig von der Konzentration und den erwarteten Proteinmassen wurden 1 – 10 µL der gepufferten Proteinlösungen mit einem Waters *ACQUITY H-Class* HPLC-System entsalzt, das mit einer *MassPrep*-Säule (WATERS) ausgestattet war. Die entsalzten Proteine wurden in die ESI-Quelle eines *Synapt G2Si*-Massenspektrometers (WATERS) durch den folgenden Gradienten von Puffer A (Wasser/0,05% Ameisensäure) und Puffer B (Acetonitril/0,045% Ameisensäure) bei einer Säulentemperatur von 60 °C und einer Flussrate von 0.1 mL min⁻¹ eluiert: Isokratische Elution mit 5% A für zwei Minuten, gefolgt von einem linearen Gradienten zu 95% B innerhalb von 8 min und Halten von 95% B für weitere 4 min.

Es wurden positive Ionen im Massenbereich von 500 – 5000 m/z nachgewiesen. Glu-Fibrinopeptid B wurde alle 45 sec zur automatischen Korrektur der Massendrift gemessen. Die gemittelten Spektren wurden nach Subtraktion der Basislinie und schließlich Glättung mit Hilfe der *MassLynx*-Instrumentensoftware mit *MaxEnt1*-Erweiterung dekonvolutiert.

7

Kapitel 7

Literaturverzeichnis

- [1] M. M. Levine, H. L. DuPont, S. B. Formal, R. B. Hornick, A. Takeuchi, E. J. Gangarosa, M. J. Snyder, J. P. Libonati, *J. Infect. Dis.* **1973**, 127, 261–270.
- [2] S. K. Niyogi, *J. Microbiol.* **2005**, 43, 133–143.
- [3] K. L. Kotloff, J. P. Winickoff, B. Ivanoff, J. D. Clemens, D. L. Swerdlow, P. J. Sansonetti, G. K. Adak, M. M. Levine, *Bull. World Health Organ.* **1999**, 77, 651–666.
- [4] A. Bowen, J. Hurd, C. Hoover, Y. Khachadourian, E. Traphagen, E. Harvey, T. Libby, S. Ehlers, M. Ongpin, J. C. Norton, A. Bicknese, A. Kimura, *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2015**, 64, 318–320.
- [5] K. C. Hyams, A. L. Bourgeois, B. R. Merrell, P. Rozmajzl, J. Escamilla, S. A. Thornton, G. M. Wasserman, A. Burke, P. Echeverria, K. Y. Green, A. Z. Kapikian, J. N. Woody, *N. Engl. J. Med.* **1991**, 325, 1423–1428.
- [6] J. Mandal, G. V, J. Emelda, M. S, S. C. Parija, *J. Clin. Diagn. Res.* **2012**, 6, 1474–1477.
- [7] T. Adam, Die Invasion von Epithelzellen durch E. coli Shigella, Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité, **2004**.
- [8] K. Rolland, N. Lambert-Zechovsky, B. Picard, E. Denamur, *Microbiology* **1998**, 144, 2667–2672.
- [9] P. J. Sansonetti, *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, 25, 3–14.
- [10] A. Donohue-Rolfe, D. W. K. Acheson, G. T. Keusch, **1991**, 293–297.
- [11] R. Campilongo, M. L. Di Martino, L. Marcocci, P. Pietrangeli, A. Leuzzi, M. Grossi, M. Casalino, M. Nicoletti, G. Micheli, B. Colonna, G. Prosseda, *PLoS One* **2014**, 9, e106589.
- [12] J. Lin, I. S. Lee, J. Frey, J. L. Slonczewski, J. W. Foster, *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 4097–4104.
- [13] G. N. Schröder, H. Hilbi, *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, 21, 134–156.
- [14] T. Sakaguchi, H. Köhler, X. Gu, B. A. McCormick, H.-C. Reinecker, *Cell. Microbiol.* **2002**, 4, 367–381.
- [15] P. J. Sansonetti, J. Arondel, J. R. Cantey, M. C. Prévost, M. Huerre, *Infect. Immun.* **1996**, 64, 2752–2764.
- [16] A. L. Man, M. E. Prieto-Garcia, C. Nicoletti, *Immunology* **2004**, 113, 15–22.
- [17] P. J. Sansonetti, J. Arondel, J. M. Cavaillon, M. Huerre, *J. Clin. Invest.* **1995**, 96, 884–892.
- [18] A. T. Harrington, P. D. Hearn, W. L. Picking, J. R. Barker, A. Wessel, W. D. Picking, *Infect. Immun.* **2003**, 71, 1255–1264.
- [19] A. Blocker, P. Gounon, E. Larquet, K. Niebuhr, V. Cabiaux, C. Parsot, P. Sansonetti, *J. Cell Biol.* **1999**, 147, 683–693.
- [20] P. J. Sansonetti, *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2001**, 280, G319–G323.
- [21] S. E. Girardin, I. G. Boneca, L. A. M. Carneiro, A. Antignac, M. Jéhanon, J. Viala, K. Tedin, M.-K. Taha, A. Labigne, U. Zähringer, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, J. Bertin, P. J. Sansonetti, D. J. Philpott, *Science* **2003**, 300, 1584–1587.
- [22] D. J. Philpott, S. Yamaoka, A. Israël, P. J. Sansonetti, *J. Immunol.* **2000**, 165, 903–914.
- [23] P. J. Sansonetti, J. Arondel, M. Huerre, A. Harada, K. Matsushima, *Infect. Immun.* **1999**, 67, 1471–1480.
- [24] C. J. Dorman, M. E. Porter, *Mol. Microbiol.* **1998**, 29, 677–684.
- [25] J. M. Durand, N. Okada, T. Tobe, M. Watarai, I. Fukuda, T. Suzuki, N. Nakata, K.

- Komatsu, M. Yoshikawa, C. Sasakawa, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 4627–4634.
- [26] J. M. B. Durand, B. Dagberg, B. E. Uhlin, G. R. Björk, *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 924–935.
- [27] J. M. Durand, G. R. Björk, A. Kuwae, M. Yoshikawa, C. Sasakawa, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 5777–5782.
- [28] N. Okada, S. Nishimura, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 3061–3066.
- [29] C. Romier, K. Reuter, D. Suck, R. Ficner, *EMBO J.* **1996**, *15*, 2850–2857.
- [30] K. Reuter, R. Ficner, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5284–5288.
- [31] C. Romier, R. Ficner, K. Reuter, D. Suck, *Proteins* **1996**, *24*, 516–519.
- [32] C. Romier, K. Reuter, D. Suck, R. Ficner, *EMBO J.* **1996**, *15*, 2850–2857.
- [33] W. Xie, X. Liu, R. H. Huang, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 781–788.
- [34] R. Brenk, M. T. Stubbs, A. Heine, K. Reuter, G. Klebe, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1066–1077.
- [35] R. K. Wierenga, *FEBS Lett.* **2001**, *492*, 193–198.
- [36] B. Stengl, K. Reuter, G. Klebe, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1926–1939.
- [37] T. Ritschel, C. Atmanene, K. Reuter, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianfèrani, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2009**, *393*, 833–847.
- [38] S. Jakobi, P. T. X. Nguyen, F. Debaene, S. Cianfèrani, K. Reuter, G. Klebe, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1897–1907.
- [39] S. Jakobi, T. X. P. Nguyen, F. Debaene, A. Metz, S. Sanglier-Cianfèrani, K. Reuter, G. Klebe, *Proteins* **2014**, *82*, 2713–2732.
- [40] F. Immekus, L. J. Barandun, M. Betz, F. Debaene, S. Petiot, S. Sanglier-Cianfèrani, K. Reuter, F. Diederich, G. Klebe, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1163–1178.
- [41] F. R. Ehrmann, J. Kalim, T. Pfaffeneder, B. Bernet, C. Hohn, E. Schäfer, T. Botzanowski, S. Cianfèrani, A. Heine, K. Reuter, F. Diederich, G. Klebe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 10085–10090.
- [42] U. Grädler, H.-D. Gerber, D. M. Goodenough-Lashua, G. A. Garcia, R. Ficner, K. Reuter, M. T. Stubbs, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 455–467.
- [43] A. W. Curnow, G. A. Garcia, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 17264–17267.
- [44] M. Müller, C. Legrand, F. Tuorto, V. P. Kelly, Y. Atlasi, F. Lyko, A. E. Ehrenhofer-Murray, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 3711–3727.
- [45] F. Tuorto, C. Legrand, C. Cirzi, G. Federico, R. Liebers, M. Müller, A. E. Ehrenhofer-Murray, G. Dittmar, H. Gröne, F. Lyko, *EMBO J.* **2018**, *37*, e99777.
- [46] M. Watanabe, M. Matsuo, S. Tanaka, H. Akimoto, S. Asahi, S. Nishimura, J. R. Katze, T. Hashizume, P. F. Crain, J. A. McCloskey, N. Okada, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20146–20151.
- [47] I. Biela, N. Tidten-Luksch, F. Immekus, S. Glinca, T. X. P. Nguyen, H. D. Gerber, A. Heine, G. Klebe, K. Reuter, *PLoS One* **2013**, *8*, e64240.
- [48] G. Phillips, B. El Yacoubi, B. Lyons, S. Alvarez, D. Iwata-Reuyl, V. De Crécy-Lagard, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 7876–7884.
- [49] R. M. McCarty, Á. Somogyi, G. Lin, N. E. Jacobsen, V. Bandarian, *Biochemistry* **2009**, *48*, 3847–3852.

- [50] S. G. Van Lanen, J. S. Reader, M. A. Swairjo, V. De Crécy-Lagard, B. Lee, D. Iwata-Reuyl, *PNAS* **2005**, *102*, 4264–4269.
- [51] R. M. McCarty, Á. Somogyi, V. Bandarian, *Biochemistry* **2009**, *48*, 2301–2303.
- [52] S. G. Van Lanen, D. Iwata-Reuyl, *Biochemistry* **2003**, *42*, 5312–5320.
- [53] C. Grimm, R. Ficner, T. Sgraja, P. Haebel, G. Klebe, K. Reuter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *351*, 695–701.
- [54] R. Zallot, R. Ross, W. H. Chen, S. D. Bruner, P. A. Limbach, V. De Crécy-Lagard, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 844–851.
- [55] Z. D. Miles, R. M. McCarty, G. Molnar, V. Bandarian, *PNAS* **2011**, *108*, 7368–7372.
- [56] B. Stengl, E. A. Meyer, A. Heine, R. Brenk, F. Diederich, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 492–511.
- [57] F. R. Ehrmann, J. Stojko, A. Metz, F. Debaene, L. J. Barandun, A. Heine, F. Diederich, S. Cianférani, K. Reuter, G. Klebe, *PLoS One* **2017**, *12*, e0175723.
- [58] K. Müller, C. Faeh, F. Diederich, *Science* **2007**, *317*, 1881–1886.
- [59] E. Schweizer, A. Hoffmann-Röder, K. Schärer, J. A. Olsen, C. Fäh, P. Seiler, U. Obst-Sander, B. Wagner, M. Kansy, F. Diederich, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 611–621.
- [60] G. Gerebtzoff, X. Li-Blatter, H. Fischer, A. Frentzel, A. Seelig, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 676–684.
- [61] K. E. Arntson, W. C. K. Pomerantz, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5158–5171.
- [62] C. T. Gee, K. E. Arntson, A. K. Urick, N. K. Mishra, L. M. L. Hawk, A. J. Wisniewski, W. C. K. Pomerantz, *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 1414–1427.
- [63] N. K. Mishra, A. K. Urick, S. W. J. Ember, E. Schönbrunn, W. C. Pomerantz, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2755–2760.
- [64] M. Acchione, Y.-C. Lee, M. E. DeSantis, C. A. Lipschultz, A. Wlodawer, M. Li, A. Shanmuganathan, R. L. Walter, S. Smith-Gill, J. J. Barchi, *Biochemistry* **2012**, *51*, 6017–6027.
- [65] J. F. Eichler, J. C. Cramer, K. L. Kirk, J. G. Bann, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2170–2173.
- [66] A. A. Bogan, K. S. Thorn, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 1–9.
- [67] C. Frieden, S. D. Hoeltzli, J. G. Bann, *Methods Enzymol.* **2004**, *380*, 400–415.
- [68] H.-W. Kim, J. A. Perez, S. J. Ferguson, I. D. Campbell, *FEBS Lett.* **1990**, *272*, 34–36.
- [69] P. B. Crowley, C. Kyne, W. B. Monteith, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10681–10683.
- [70] J. Gavenonis, B. A. Sheneman, T. R. Siegert, M. R. Eshelman, J. A. Kritzer, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 716–722.
- [71] M. Neeb, P. Czodrowski, A. Heine, L. J. Barandun, C. Hohn, F. Diederich, G. Klebe, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5554–5565.
- [72] E. W. W. Leung, H. Yagi, J. R. Harjani, M. D. Mulcair, M. J. Scanlon, J. B. Baell, R. S. Norton, *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, *84*, 616–625.
- [73] A. Nguyen, Masterarbeit - Störung der essentiellen Protein-Protein-Interaktion zur Inhibition der tRNA-Guanin-Transglycosylase, Philipps-Universität Marburg, **2016**.
- [74] M. El Khattabi, M. L. van Roosmalen, D. Jager, H. Metselaar, H. Permentier, K. Leenhouts, J. Broos, *Biochem. J.* **2008**, *409*, 193–198.

- [75] W. C. Pomerantz, N. Wang, A. K. Lipinski, R. Wang, T. Cierpicki, A. K. Mapp, *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 1345–1350.
- [76] J. L. Kitevski-LeBlanc, F. Evanics, R. Scott Prosser, *J. Biomol. NMR* **2010**, 48, 113–121.
- [77] J. T. Gerig, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, 26, 293–370.
- [78] D. S. Wishart, C. G. Bigam, J. Yao, F. Abildgaard, H. J. Dyson, E. Oldfield, J. L. Markley, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1995**, 6, 135–140.
- [79] W. Kabsch, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, 66, 125–132.
- [80] A. J. McCoy, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**, 63, 32–41.
- [81] Collaborative Computational Project, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1994**, 50, 760–763.
- [82] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkóczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, P. H. Zwart, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, 66, 213–221.
- [83] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, 60, 2126–2132.
- [84] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605–1612.
- [85] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, *J. Appl. Cryst.* **1993**, 26, 283–291.
- [86] G. J. Kleywegt, J.-Y. Zou, in *Int. Tables Crystallogr. Vol. F Crystallogr. Biol. Macromol.*, Edited By M. G. Rossmann & E. Arnold, Springer Netherlands, **2006**, pp. 353–356.
- [87] T. Ritschel, S. Hoertner, A. Heine, F. Diederich, G. Klebe, *ChemBioChem* **2009**, 10, 716–727.
- [88] S. R. Hörtner, T. Ritschel, B. Stengl, C. Kramer, W. B. Schweizer, B. Wagner, M. Kansy, G. Klebe, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 8266–8269.
- [89] L. J. Barandun, F. Immekus, P. C. Kohler, T. Ritschel, A. Heine, P. Orlando, G. Klebe, F. Diederich, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2013**, 69, 1798–1807.
- [90] M. Neeb, M. Betz, A. Heine, L. J. Barandun, C. Hohn, F. Diederich, G. Klebe, *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 5566–5578.
- [91] M. Neeb, C. Hohn, F. R. Ehrmann, A. Härtsch, A. Heine, F. Diederich, G. Klebe, *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 4900–4910.
- [92] L. J. Barandun, F. R. Ehrmann, D. Zimmerli, F. Immekus, M. Giroud, C. Grünenfelder, W. B. Schweizer, B. Bernet, M. Betz, A. Heine, G. Klebe, F. Diederich, *Chem. - A Eur. J.* **2015**, 21, 126–135.
- [93] T. ACD/Labs, Version 12.01, Advanced Chemistry Development, **2009**.
- [94] J. Sangster, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1989**, 18, 1111–1227.
- [95] E. Gallicchio, M. M. Kubo, R. M. Levy, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4526–4527.
- [96] T. S. G. Olsson, J. E. Ladbury, W. R. Pitt, M. A. Williams, *Protein Sci.* **2011**, 20, 1607–1618.
- [97] J. D. Chodera, D. L. Mobley, *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, 42, 121–142.
- [98] L. Di, C. Keefer, D. O. Scott, T. J. Strelevitz, G. Chang, Y. A. Bi, Y. Lai, J. Duckworth, K. Fenner, M. D. Troutman, R. S. Obach, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 57, 441–448.

- [99] P. C. Kohler, T. Ritschel, W. Bernd Schweizer, G. Klebe, F. Diederich, *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15*, 10809–10817.
- [100] L. J. Barandun, F. Immekus, P. C. Kohler, S. Tonazzi, B. Wagner, S. Wendelspiess, T. Ritschel, A. Heine, M. Kansy, G. Klebe, F. Diederich, *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18*, 9246–9257.
- [101] S. G. Krimmer, J. Cramer, M. Betz, V. Fridh, R. Karlsson, A. Heine, G. Klebe, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10530–10548.
- [102] K. Chiesa, B. Bernet, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 1822–1843.
- [103] M. M. Teeter, *PNAS* **1984**, *81*, 6014–6018.
- [104] S. Vaitheeswaran, H. Yin, J. C. Rasaiah, G. Hummer, *PNAS* **2004**, *101*, 17002–17005.
- [105] J. Lee, S. H. Kim, *Protein Sci.* **2009**, *18*, 1370–1376.
- [106] M. Betz, T. Wulsdorf, S. G. Krimmer, G. Klebe, *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 223–233.
- [107] P. R. Gerber, K. Müller, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1995**, *9*, 251–268.
- [108] A. Nicholls, K. A. Sharp, B. Honig, *Proteins* **1991**, *11*, 281–296.
- [109] J. E. Ladbury, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 973–980.
- [110] S. W. Homans, *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 534–539.
- [111] R. Baron, P. Setny, J. Andrew McCammon, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12091–12097.
- [112] P. W. Snyder, J. Mecinović, D. T. Moustakas, S. W. Thomas, M. Harder, E. T. Mack, M. R. Lockett, A. Héroux, W. Sherman, G. M. Whitesides, *PNAS* **2011**, *108*, 17889–17894.
- [113] F. Spyraakis, M. H. Ahmed, A. S. Bayden, P. Cozzini, A. Mozzarelli, G. E. Kellogg, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 6781–6828.
- [114] A. Biela, N. N. Nasief, M. Betz, A. Heine, D. Hangauer, G. Klebe, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 1868–1876.
- [115] S. G. Krimmer, M. Betz, A. Heine, G. Klebe, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 833–846.
- [116] J. Cramer, S. G. Krimmer, A. Heine, G. Klebe, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 5791–5799.
- [117] G. Klebe, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 95–110.
- [118] E. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210–1250.
- [119] J. S. Mills, A. Bowers, C. Djerassi, H. J. Ringold, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3399–3404.
- [120] M. Britzi, E. Perucca, S. Soback, R. H. Levy, C. Fattore, F. Crema, G. Gatti, D. R. Doose, B. E. Maryanoff, M. Bialer, *Epilepsia* **2005**, *46*, 378–384.
- [121] C. Priem, A. Wuttke, M. Berditsch, A. S. Ulrich, A. Geyer, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 12366–12376.
- [122] M. Katz, E. H. Gans, *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101*, 2271–2280.
- [123] S. Keller, C. Vargas, H. Zhao, G. Piszczek, C. A. Brautigam, P. Schuck, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5066–5073.
- [124] J. C. D. Houtman, P. H. Brown, B. Bowden, H. Yamaguchi, E. Appella, L. E. Samelson, P. Schuck, *Protein Sci.* **2007**, *16*, 30–42.
- [125] H. Fukada, K. Takahashi, *Proteins* **1998**, *33*, 159–166.
- [126] R. N. Goldberg, N. Kishore, R. M. Lennen, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2002**, *31*, 231–370.
- [127] C. A. Brautigam, *Methods Enzymol.* **2015**, *562*, 109–133.

- [128] L. D. Movsisyan, E. Schäfer, A. Nguyen, F. R. Ehrmann, A. Schwab, T. Rossolini, D. Zimmerli, B. Wagner, H. Daff, A. Heine, G. Klebe, F. Diederich, *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24*, 9957–9967.
- [129] D. A. Erlanson, S. W. Fesik, R. E. Hubbard, W. Jahnke, H. Jhoti, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 605–619.
- [130] J. D. Sadowsky, M. A. Burlingame, D. W. Wolan, C. L. McClendon, M. P. Jacobson, J. A. Wells, *PNAS* **2011**, *108*, 6056–6061.
- [131] D. C. Rees, Congreve Miles, C. W. Murray, R. Carr, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 660–672.
- [132] D. A. Erlanson, R. S. McDowell, T. O'Brien, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3463–3482.
- [133] P. J. Hajduk, *Mol. Interv.* **2006**, *6*, 266–272.
- [134] S. L. McGovern, E. Caselli, N. Grigorieff, B. K. Shoichet, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1712–1722.
- [135] M. R. Arkin, J. A. Wells, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 301–317.
- [136] B. Ma, T. Elkayam, H. Wolfson, R. Nussinov, *PNAS* **2003**, *100*, 5772–5777.
- [137] J. A. Wells, C. L. McClendon, *Nature* **2007**, *450*, 1001–1009.
- [138] D. A. Erlanson, J. A. Wells, A. C. Braisted, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, *33*, 199–223.
- [139] P. Nagy, *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1623–1641.
- [140] D. N. Reddy, E. N. Prabhakaran, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 680–683.
- [141] B.-Q. Shen, K. Xu, L. Liu, H. Raab, S. Bhakta, M. Kenrick, K. L. Parsons-Reponce, J. Tien, S.-F. Yu, E. Mai, D. Li, J. Tibbitts, J. Baudys, O. M. Saad, S. J. Scales, P. J. McDonald, P. E. Hass, C. Eigenbrot, T. Nguyen, W. A. Solis, R. N. Fuji, K. M. Flagella, D. Patel, S. D. Spencer, L. A. Khawli, A. Ebens, W. L. Wong, R. Vandlen, S. Kaur, M. X. Sliwowski, R. H. Scheller, P. Polakis, J. R. Junutula, *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 184–189.
- [142] P. M. S. D. Cal, G. J. L. Bernardes, P. M. P. Gois, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 10585–10587.
- [143] A. D. Baldwin, K. L. Kiick, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 1946–1953.
- [144] B. Bernardim, P. M. S. D. Cal, M. J. Matos, B. L. Oliveira, N. Martínez-Sáez, I. S. Albuquerque, E. Perkins, F. Corzana, A. C. B. Burtoloso, G. Jiménez-Osés, G. J. L. Bernardes, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13128.
- [145] J. Schulze Wischeler, D. Sun, N. U. Sandner, U. Linne, A. Heine, U. Koert, G. Klebe, *Chem. – A Eur. J.* **2011**, *17*, 5842–5851.
- [146] F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2212–2221.
- [147] S. Chong, A. W. Curnow, T. J. Huston, G. A. Garcia, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3694–3701.
- [148] G. A. Garcia, D. L. Tierney, S. Chong, K. Clark, J. E. Penner-Hahn, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3133–3139.
- [149] A. W. Curnow, F. L. Kung, K. A. Koch, G. A. Garcia, *Biochemistry* **1993**, *32*, 5239–5246.
- [150] I. S. Moreira, J. M. Martins, R. M. Ramos, P. A. Fernandes, M. J. Ramos, *Biophys. Acta* **2013**, *1834*, 404–414.
- [151] O. Keskin, B. Ma, R. Nussinov, *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 1281–1294.
- [152] C. Yan, F. Wu, R. L. Jernigan, D. Dobbs, V. Honavar, *Protein J.* **2008**, *27*, 59–70.

- [153] I. S. Moreira, P. A. Fernandes, M. J. Ramos, *Proteins* **2013**, 803–812.
- [154] L. M. Salonen, M. Ellermann, F. Diederich, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, 50, 4808–4842.
- [155] A. Divakaran, S. E. Kirberger, W. C. K. Pomerantz, *Acc. Chem. Res.* **2019**, 52, 3407–3418.

Danksagung

Zuerst möchte ich **PROF. GERHARD KLEBE** für seine bemühte und wissenschaftliche Unterstützung meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Ich danke ihm auch für die Korrekturen dieser Arbeit und das immense Vertrauen in mich, das es ermöglicht hat, frei an den gestellten Fragen zu arbeiten.

PROF. KLAUS REUTER danke ich für die hilfreichen Diskussionen zu dieser Arbeit (insbesondere Kapitel 5) und für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ich bin **PROF. ANDREAS HEINE** sehr dankbar, dass er mich in die makromolekulare Röntgenkristallographie eingeführt und mich in den vergangenen Jahren bei kristallographischen Fragen unterstützt hat.

Im Weiteren bedanke ich mich bei **PROF. DR. MAIKE PETERSEN** und **PROF. DR. CORNELIUS KRASEL** dafür, dass sie sich dazu bereit erklärt haben meiner Prüfungskommission anzuhören.

Ich danke **ELISABETH SCHÄFER**, **LEVON MOVSISYAN**, **LUZI JAKOB BARANDUN**, **TONI PFAFFENEDER**, **JORNA KALIM** und **PROF. FRANÇOIS DIEDERICH** (ETH Zürich) für die synthetische Unterstützung aller in dieser Arbeit untersuchten *lin*-Benzoguanin-Liganden, für die kollegiale Zusammenarbeit und die sehr konstruktiven Videokonferenzen.

Ich möchte **GERD GEMMECKER**, **CHARLOTTE SOFTLEY** und **PROF. MICHAEL SATTLER** (TU München) für das gemeinsame Projekt bezüglich der ^{19}F -NMR-Messungen danken, ohne die das Projekt aus Kapitel 2 nicht möglich wäre.

Aus meinen eigenen Reihen möchte ich **DZUNG NGUYEN**, **MAURICE SEBASTIANI** und **STEFFI DÖRR** für ihre Zusammenarbeit im S1-Labor/Radioaktiv-Labor danken. Ohne diese Personen wäre der Abschluss eines Projektes (Kapitel 5) nicht erdenklich gewesen.

Für die angenehme Kooperation mit **LUKAS HEYDER** (**PROF. WIBKE DIEDERICH**, Philipps-Universität Marburg) danke ich für die Herstellung weiterer maßgeschneiderter Liganden.

Ich danke **OSCAR HERNANDEZ-ALBA**, **FRANÇOIS DEBAENE** und **DR. SARAH CIANFERANI-SANGLIER** (Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de Strasbourg) für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen der TGT.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **CHRISTIAN SOHN** für die Betreuung und Wartung der *in-house* Röntgengeräte, seine große Hilfsbereitschaft in technischen Fragestellungen.

Bedanken möchte ich mich bei Frau **LYDIA HARTLEBEN** für die vielfältige Unterstützung und Hilfsbereitschaft, gerade im Zusammenhang mit zahlreichen Dienstreisen.

Generell möchte ich mich beim *beamline support* sowie insbesondere **MANFRED WEISS** und **JAN WOLLENHAUPT** von BESSY II für ihre Unterstützung bedanken.

Fürs Korrekturlesen einiger Kapitel dieser Arbeit danke ich **DZUNG NGUYEN**, **STEFFEN GLÖCKNER** und **ANNA-MARIA GILG**.

Ein großes Dankeschön an die Administratoren der Arbeitsgruppe für die Wartung des Netzwerks und der Computer, ohne die diese Arbeit nicht möglich wäre.

Der Serviceabteilung "Massenspektrometrie und Elementanalytik" rund um **DR. UWE LINNE** danke ich für die vermessenen Proben, die auch zum Erfolg dieser Dissertation führten.

Ohne die Mitarbeit zahlreicher Vertiefungsstudenten wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen: **CHRISTINE KUPPSCHUS**, **LINDA SCHMIDT**, **REBECCA FEYH**, **JESSICA PILGRAM**, **ALEXANDER LICHTENBERG**, **NAM NGUYEN**, **NINA SCHMIDT** und **LUNA SCHMACKE**.

Insbesondere möchte ich **DZUNG NGUYEN** für die Zeit danken, die wir während unserer Doktorarbeit zusammen verbracht haben. Als Büropartner warst du mir in den zahlreichen Gesprächen immer eine besondere Hilfe und hast mich oft in die richtige Richtung geführt. Die Erfahrung in Japan/China mit dir wird immer unvergesslich bleiben.

Ohne diese Personen wäre die Zeit in der Arbeitsgruppe nicht dasselbe gewesen und machte diesen Lebensabschnitt einzigartig: **DZUNG NGUYEN**, **STEFFEN GLÖCKNER**, **MARKO KLJAJIC**, **KHANG NGO**, **FRANCESCA MAGARI**, **ANNA SANDNER**, **ALEXANDER METZ** und **TOBIAS WULSDORF-HÜFNER**.

Besonders danken möchte ich **STEFFEN GLÖCKNER** für die zahlreichen Eiskaffees und die offenen Diskussionen die wir miteinander geführt haben. **FRANCESCA MAGARI** danke ich für ihre Offenherzigkeit und die Zeit die wir zusammen gelacht haben.

Ich danke den Mitgliedern der AG Klebe und Kolb für die gute Zusammenarbeit und Atmosphäre. Im speziellen danke ich **MATTHIAS OEBEKKE**, **LEA-SOPHIE HUBERT**, **JANIK HEDDERICH**, **MARIA GIOVANNA PAPADOPOULOS**, **COREY TAYLOR**, **MAGDALENA SCHARF** und **MATTHÄUS DRABEK**.

Ich danke **ANNA-MARIA GILG** für die unvergessliche Zeit, die wir zusammen verbracht haben. Kann so weiter gehen.

Abschließend möchte ich **HANSI** und **ULLA BURR** für ihre unendliche Unterstützung und ihr Vertrauen danken, dass sie in mich gesetzt haben.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name An Andreas Nguyen
Geburtsdatum 22.02.1991
Geburtsort Göttingen, Deutschland
Nationalität Deutsch

Schul- und Hochschulbildung

01.17 - 10.2020 **Dr. rer. nat**
(voraussichtlich) Abschlussarbeit: *Neue Ansätze zur Entwicklung von Modulatoren der homodimeren tRNA-Guanin-Transglycosylase*
Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg, Deutschland

10.2014 - 12.2016 **M.Sc. in Chemie**
Abschlussarbeit: *Störung der essentiellen Protein-Protein-Interaktion zur Inhibition der tRNA-Guanin-Transglycosylase*
Philipps-Universität Marburg, Deutschland

10.2011 - 09.2014 **B.Sc. in Biochemie**
Abschlussarbeit: Synthese und Untersuchung eines dinuklearen Kupfer(II)-Komplexes (zur Phenoloxidation)
Georg-August-Universität Göttingen, Deutschland

2007 - 2011 **Allgemeine Hochschulreife**
Geschwister Scholl Gesamtschule, Göttingen

2003 - 2007 **Erweiterter Realschulabschluss**
Bonifatiuschule II, Göttingen

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

Neue Ansätze zur Entwicklung von Modulatoren der homodimeren tRNA-Guanin-Transglycosylase

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, sowie alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den _____

(Andreas Nguyen)

